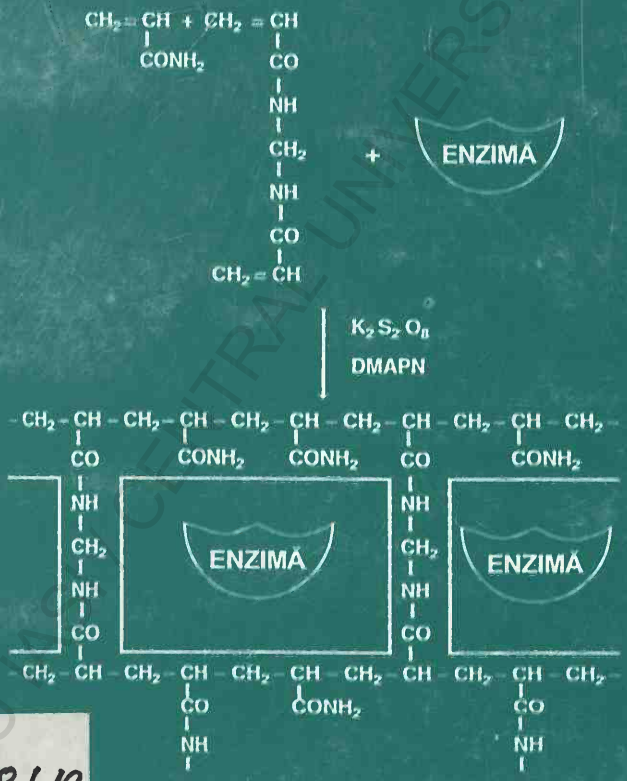
LUCIA DIMA

ENZIME IMOBILIZATE



II 328.419

Editura MIRTON Timisoara - 1999

BCU "VASILE GOLDIS" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

LUCIA DIMA
doctor în biochimie

ENZIME IMOBILIZATE

B.C.U.- IASI 553994

Editura MIRTON
Timişoara, 1999

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Familiei mele

12.05.1999
B.C.U. „M. EMINESCU"
- IAŞI -
ale 820.940
577.15 Entomologie

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuprins

Prefața 7

Introducere 9

Cap. I. **Metode de legare a enzimelor pe un suport insolubil în apă** 13
1.1. Imobilizarea enzimelor prin adsorbție fizică 13
1.2. Metode de imobilizare a enzimelor prin legături ionice 15
1.3. Imobilizarea enzimelor prin legături covalente 17

Cap. II. **Metode de legare încrucișată a enzimelor în scopul imobilizării lor** 47

Cap. III. **Imobilizarea enzimelor prin incluziune** 52
3.1. Imobilizarea enzimelor prin includere în geluri. .. 52
3.2. Imobilizarea enzimelor prin microcapsulare. 55

Cap. IV. 58
4.1. Caracterizarea generală a glucozoxidazei 58
4.2. Metode, tehnici și procedee de imobilizare a glucozoxidazei. 65

Cap. V. **Materiale și metode folosite în studiul experimental** 70
1. Activarea suportului 70
2. Imobilizarea enzimelor pe suport 71
3. Determinarea activității enzimatice a soluțiilor de glucozoxidază 71
4. Determinarea activității glucozoxidazei imobilizate 76

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Determinarea pH-ului optim de acțiune 7
6. Determinarea influenței concentrației substratului asupra activității glucozoxidazice 7
7. Determinarea temperaturii optime de acțiune a glucozoxidazei 8
8. Determinarea stabilității în timp a preparatelor enzimatice imobilizate 8

BIBLIOGRAFIE 8

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prefață

Deși sunt catalizatori cu o foarte mare specificitate, totuși folosirea enzimelor pe scară largă, în practică, se izbește de scăderea stabilității preparatelor sau a soluțiilor conținând enzime.

Imobilizarea enzimelor, în acest context, pare să reprezinte soluția pentru creșterea stabilității. Lucrarea își propune să exemplifice diferite modalități de imobilizare, luând drept criteriu de sistematizare, natura interacțiunilor prin care se realizează imobilizarea.

Problema imobilizării de enzime este deosebit de complexă și laborioasă deoarece imobilizarea trebuie să se realizeze prin implicarea altor grupe funcționale, diferite de cele din centrul catalitic activ. Din acest motiv imobilizarea se va particulariza în funcție de enzimă. Reușita unui astfel de demers poate deschide noi perspective în medicină, industria alimentară, biotehnologii.

Autoarea

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există oameni pe care este suficient să
cunoști spre a-i iubi, respecta, onora și admir
Mulțumesc și pe această cale domnului profes
doctor docent ***Ioan Florea Dumitru*** *pentr*
ajutorul, competența, înțelegerea pe care mi le-
acordat de-a lungul timpului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Introducere

Enzimele sunt catalizatori biologici, de regulă proteine simple sau complexe, caracterizate prin posibilitatea de a cataliza reacţii în soluţii apoase acide, neutre sau alcaline, în condiţii blânde, la temperatură obişnuită şi presiune normală. Enzimele au fost utilizate de oameni din cele mai vechi timpuri, cu mult înainte de a li se cunoaşte structura. Folosirea enzimelor a fost mult extinsă în ultimele decenii în industria alimentară, textilă, în medicină, biotehnologii, farmaceutică etc.

Deşi foarte eficiente în procesul de cataliză, enzimele prezintă dezavantajul că sunt în general instabile la temperaturi mari ca şi în prezenţa unor cationi sau anioni. În general, reacţia enzimatică are loc în soluţii apoase, prin incubarea unei soluţii apoase a substratului şi a enzimei solubile. În vitro este însă dificilă recuperarea enzimei într-o formă activă din mediul de reacţie, după ce reacţia enzimatică a avut loc. Enzima se poate denatura prin variaţia pH-ului sau în urma diferitelor tratamente fizice şi chimice la care este supusă. Pentru a elimina aceste dezavantaje, care fac folosirea enzimelor neeconomică şi pentru a obţine catalizatori de înaltă specificitate şi stabilitate, cercetătorii au încercat să fixeze enzimele pe suporturi solide de diferite naturi, folosindu-se în acest scop de proprietăţile lor fizico-chimice.

Imobilizarea enzimelor îmbogăţeşte totodată cunoaşterea structurii, activităţii şi mecanismului de reacţie a enzimelor. În vivo multe enzime sunt legate de membrana celulară sau de diferite organite. În acest context, enzimele imobilizate pot fi considerate un model experimental al acestor enzime native.

Nelson şi Griffin sunt primii cercetători care au descoperit că o enzimă fixată pe un suport îşi păstrează activitatea enzimatică. Autorii au arătat că invertaza extrasă din drojdie se adsoarbe pe cărbune activ şi are activitate catalitică apropiată de cea a enzimei native.

În 1948, Sumner a arătat că ureaza din soia devine insolubilă prin staţionare timp de 1-2 zile, la temperatura camerei, într-o soluţie conţinând 30% alcool şi clorură de sodiu. În 1953, Grubhofer şi Schleith raportează imobilizarea carboxipeptidazei, diastazei, pepsinei, ribonucleazei, prin folosirea răşinilor poliaminostirenice dizotate.

Prima comunicare care a suscitat un interes deosebit a fost imobilizarea aminoacilazei în 1965 şi a deschis calea aplicării industriale a enzimelor imobilizate, în speţă în scopul separării izomerilor optici ai aminoacizilor, din amestecuri racemice.

În ceea ce priveşte proveniența enzimelor imobilizate, sunt preferate enzimele microbiene care au un preţ de cost scăzut, timp de producere scurt, permit industrializarea procedeelor de obţinere şi nu condiţionează producţia de enzimă de alţi parametrii (climă, sezon, altitudine etc.).

Enzimele elaborate de microorganisme pot fi intracelulare şi atunci trebuiesc extrase după dezintegrarea celulelor, sau pot fi extracelulare când se regăsec în mediul de cultură al microorganismului respectiv. Prin procedeele de extracţie utilizate în mod curent, se constată de obicei o pierdere parţială a activităţii enzimatice şi o slabă stabilitate în timp a preparatului. De aceea unii autori au încercat imobilizarea dierectă a celulelor microbiene. Astfel, Chibata, în 1973 a prezentat pentru prima dată în lume, imobilizarea de celule microbiene, în scopul producerii acidului L-aspartic.

Enzimele imobilizate sunt definite ca "enzime fizic limitate sau localizate într-o regiune definită a spaţiului cu păstrarea activităţii lor enzimatice şi care pot fi folosite continuu şi repetat." Deci, enzimele care sunt modificate prin fixare pe

suporturi, sunt aduse într-o formă insolubilă în apă și satisfac această definiție. Pentru manifestarea activității catalitice a unei enzime este necesară păstrarea conformației specifice a centrului catalitic activ, care interacționează cu substratul. Centrul catalitic activ este format din câteva resturi de aminoacizi, care definesc o regiune geometric discretă, cu conformație tridimensională, necesară pentru exprimarea activității catalitice. De aceea, imobilizarea enzimelor trebuie realizată în așa fel încât să nu fie afectată conformația tridimensională a centrului activ, ceea ce ar avea ca efect scăderea dramatică a activității enzimei imobilizate.

Grupările funcționale ale moleculelor de enzimă implicate în imobilizare sunt: grupările amino libere, grupările carboxil, grupările sulfhidril ale cisteinei, grupările imidazol ale histidinei, grupările fenolice și grupările hidroxil ale serinei și treoninei. Pentru menținerea activității enzimatice este important ca grupările funcționale din centrul activ, să nu participe la imobilizare. În același timp, procedeele de imobilizare nu trebuie

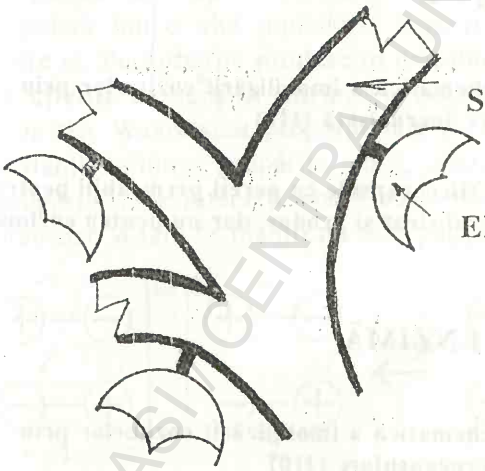


Fig. 1. **Reprezentarea schematică a imobilizării enzimelor prin legare pe un suport (110)**

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITAR

să se realizeze la temperaturi mari și nici la tării ionice mari, care ar afecta activitatea enzimei.

Metodele de imobilizare a enzimelor pot fi clasificate în trei tipuri fundamentale: (1) Metode de legare a enzimelor pe un suport insolubil în apă, (2) Metode de legare încrucișată a enzimelor și (3) Metode de imobilizare prin includere. În figurile 1-3 redăm schematic cele trei tipuri fundamentale de imobilizare a enzimelor, care sunt frecvent utilizate în diverse scopuri practice.

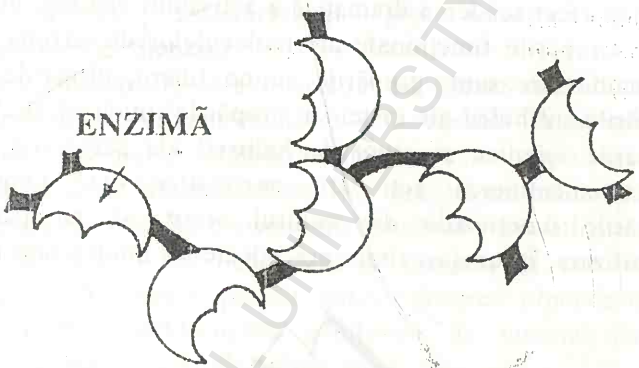


Fig. 2. **Reprezentarea schematică a imobilizării enzimelor prin legare încrucișată (110)**

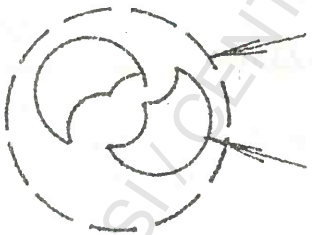


Fig. 3. **Reprezentarea schematică a imobilizării enzimelor prin microcapsulare (110)**

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul I

Metode de legare a enzimelor pe un suport insolubil în apă

1.1. *Imobilizarea enzimelor prin adsorbție fizică*

Adsorbția este un procedeu de legare reversibilă a enzimei de suportul insolubil și se realizează în principal prin două tipuri de mecanisme: prin forțe Van der Waals și prin forțe hidrofobe.

Forțele Wan der Waals reprezintă rezultatul interacțiunilor mutuale ale elecronilor și nucleelor moleculelor, în care se induc momente electrice de tip dipol instantanee. Perturbarea temporară a distribuției păturii electronice exterioare dintr-o moleculă, formează un dipol care induce la rândul său o perturbare dipolară într-o altă moleculă. Dipolii rezultați pot interacționa între ei. Perturbările produse în distribuția păturilor exterioare pot fi diferite ca sens și din acest motiv, dipolii oscilează. Forțele Van der Waals sunt proporționale cu inversul puterii a șaptea a distanței dintre grupările care interacționează. Deci, cu cât grupările care interacționează sunt mai apropiate, cu atât forțele Van der Waals se manifestă mai puternic. (Fig. 4).

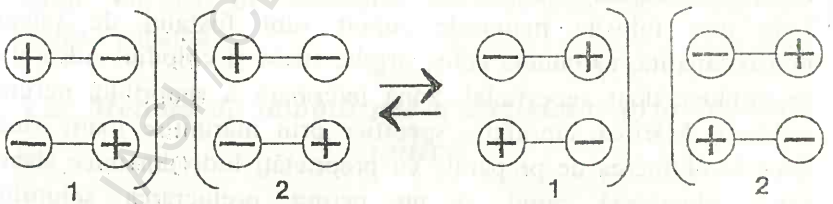


Fig. 4. **Stabilirea forțelor de atracție Van der Waals între dipolii oscilanți induși în păturile electronice exterioare a celor două molecule vecine (1 și 2)**

Forțele de interacțiune hidrofobă sunt cauzate de prezența în molecula enzimei a resturilor de aminoacizi cu caracter hidrofob cum ar fi valina, leucina, izoleucina, prolina, fenilalanina. În soluții apoase, moleculele de apă prezintă în apropierea grupărilor hidrofobe, o anumită orientare, caracterizată din punct de vedere energetic de o valoare mai mare decât în cazul unei distribuții întâmplătoare. Dacă grupările hidrofobe vin în contact, are loc eliberarea moleculelor de apă adiacente, proces favorizat din punct de vedere energetic. (Fig. 5).

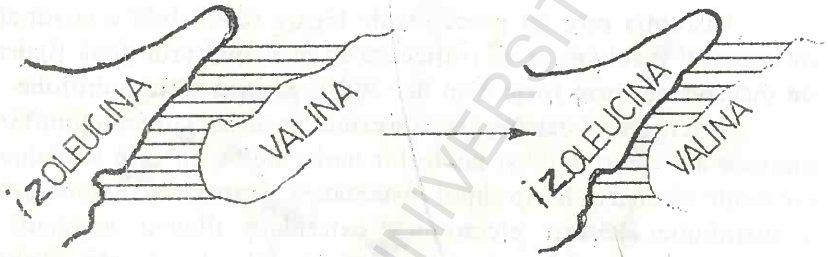


Fig. 5. **Stabilirea interacției hidrofobe între două suprafețe conținând resturi de aminoacizi cu caracter hidrofob, prin eliminarea moleculelor de apă adiacente (porțiunea haşurată reprezentând moleculele de apă se îngustează, dovedind eliminarea apei dintre suprafețele cu caracter hidrofob)**

Pot servi ca materiale suport ceramica, sticla, silicagelul, oxizi şi hidroxizi ai metalelor, polizaharide, rășini organice etc. Cele mai folosite materiale suport sunt fosfatul de calciu, hidroxilapatita, cărbunele activ, argila, sticla şi colodiu. Adsorbția se produce doar superficial, zona interioară a suportului nefiind utilizată. Mărirea suprafeței specifice prin măruntire foarte fină, duce la obținerea de preparate cu proprietăți hidrodinamice slabe, care colmatează rapid şi nu permit prelucrarea soluțiilor concentrate de substrat, cu vâscozitate ridicată. Dacă materialul suport este încărcat electrostatic, vecinătatea electrică a enzimei se modifică, ducând la modificarea pH-ului optim de acțiune.

Desorbția enzimei de pe suport se produce la modificarea pH-ului mediului de reacție, a tăriei sale ionice sau la simpla ridicare a temperaturii. De cele mai multe ori desorbția se realizează relativ ușor. Produșii reacției pot fi impurificați cu enzimă, ceea ce constituie un dezavantaj. Prin desorbție, urmată de o nouă adsorbție poate fi regenerat suportul într-o formă activă.

Prin procedee de adsorbție a enzimelor pe diferite suporturi solide s-a putut observa o mai mare stabilitate termică a lor ca și o mai mare stabilitate la depozitare, de asemenea o mai mare rezistență față de acțiunea enzimelor proteolitice. Încă din 1916, Nelson și Griffin au observat că invertaza adsorbită pe cărbune activ, își păstrează activitatea. În 1955, Stone, adaugă la soluția conținând alfa-amilază, cărbune activ, la 10 °C, agitând amestecul timp de o oră. După filtrare, complexul rezultat, adică enzima imobilizată a fost folosit pentru umplerea unei coloane în scopul producerii continue a glucozei din amidon.

Au fost realizate și imobilizări de enzime prin interacții hidrofobe cu suportul. Visser J. imobilizează lipoil-amidaza prin legare pe un suport conținând resturi hidrofobe, de exemplu, butil-Sepharoza, hexil-Sepharoza. Alte suporturi necesită o activare prealabilă. Astfel, aminohexil-celuloza se poate activa cu epiclorhidrina, în timp ce taninul se activează cu BrCN. Din cele două suporturi activate se poate realiza adsorbantul propriu-zis tanin-aminohexil-celuloza, folosit pentru imobilizarea mai multor enzime de exemplu aminoacilaza, glucoizomeraza, lactaza, papaina.

1.2. *Metode de imobilizare a enzimelor prin legături ionice*

Imobilizarea enzimelor prin legături ionice se bazează pe formarea de legături ionice între enzimă și suportul insolubil. Ca suporturi insolubile sunt folosite polizaharidele și unii polimeri

sintetici, care au resturi ionice. Legarea enzimelor la suportul insolubil se realizează relativ uşor, în condiţii mult mai blânde decât în cazul legării covalente. Forţele de legare dintre enzimă şi suport sunt mai slabe decât în cazul legării covalente, eluarea enzimei producându-se prin mărirea puterii ionice a soluţiei sau prin variaţia pH-ului. Legarea prin legături ionice a enzimelor la suportul insolubil, nu determină schimbarea conformaţiei centrului activ, sau determină schimbări nesemnificative, deoarece enzimele imobilizate prin aceste legături prezintă în cele mai multe din cazuri activitate catalitică mare.

Prima imobilizare a catalazei prin legături ionice, a fost realizată de Minz. Imobilizarea a avut loc prin trecerea soluţiei de catalază printr-o coloană conţinând DEAE-celuloza. Prin trecerea apoi prin coloană a unei soluţii de apă oxigenată, se constată că aceasta nu mai este detectată în efluent, ceea ce constituie un indiciu al manifestării activităţii enzimei imobilizate.

În scopul separării eficiente a L-aminoacizilor din amestecuri racemice de sinteză, a fost studiată posibilitatea imobilizării aminoacilazei. Imobilizarea aminoacilazei a avut loc pe schimbători de anioni de tipul DEAE-celuloza, TEAE-celuloza, ECTEOLA-celuloza, DEAE-Sephadex. De exemplu, DEAE-Sephadex (forma OH) a fost adăugată peste o soluţie a aminoacilazei, în tampon fosfat 0,1M şi amestecul a fost agitat 5 ore la 37 °C. Prin acest procedeu simplu aminoacilaza a fost legată ionic de DEAE-Sephadex. Se mai poate face menţiunea că stabilitatea aminoacilazei imobilizate prin legături ionice pe schimbătorul de anioni este mare.

Alţi autori au încercat să imobilizeze enzime prin legături ionice, după ce în prealabil au mărit sarcina ionică a enzimelor prin tratamente chimice. Astfel, grupările anionice slabe ale glucoamilazei au fost modificate prin legare covalentă de un copolimer al etenei cu anhidrida maleică. Derivatul enzimatic polianionic se leagă puternic de schimbători de anioni de tipul

DEAE-celuloză, DEAE-Sephadex. S-a observat ca glucoamilaza imobilizată este mult mai stabilă. Pe de altă parte comparând glucoamilaza netratată şi imobilizată cu gluocoamilaza tratată şi imobilizată s-a putut constata că aceasta din urmă este mult mai stabilă.

1.3. *Imobilizarea enzimelor prin legături covalente*

Aceste metode se bazează pe imobilizarea enzimelor pe suportul insolubil, prin legături covalente. Enzima participă la formarea de legături covalente, prin intermediul grupărilor amino (alfa şi epsilon) a grupărilor carboxil (alfa, beta sau gamma), a grupărilor sulfhidril, hidroxil, imidazol, fenol. În reacţiile de cuplare, aceste grupe funcţionale reacţionează cu grupările diazoniu, azidă, izocianat ale suportului. Imobilizarea enzimei prin legarea covalentă de suport, poate modifica structura conformaţională a centrului activ al enzimei, având ca efect scăderea activităţii ei şi (sau) modificarea specificităţii pentru substrat. Legarea enzimei fiind puternică, eluarea enzimei nu are loc decât în prezenţa substratului, sau prin aducerea soluţiilor la tării ionice mari. După modul de legare, metodele de imobilizare a enzimelor prin legături covalente, se pot clasifica în "metode diazo", "metode peptidice", şi "metode alchil".

1.3.1. "Metode diazo" de imobilizare a enzimelor

Aceste metode se bazează pe cuplarea diazo a enzimelor la derivaţii diazoniu ai suportului. Suportul conţinând grupări amino aromatice, este tratat cu acid nitros. Derivatul diazoniu nou format este capabil să reacţioneze cu enzima. Enzima participă la cuplarea diazo prin grupările amino libere, prin grupările imidazol ale histidinei sau prin grupările fenol ale tirozinei.

Suportul pentru cuplarea diazo poate fi reprezentat de derivaţi polizaharidici, copolimeri ai aminoacizilor, derivaţi

poliacrilamidici, rășini stirenice, copolimeri ai etenei cu acidul maleic, derivați aminosilanici (Fig. 6 și Fig. 7).

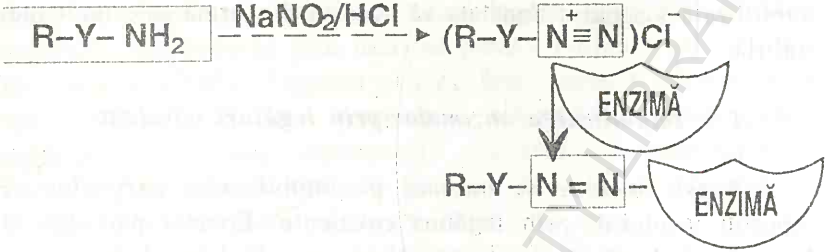


Fig. 6. **Reprezentarea schematică a reacției de cuplare a enzimei prin metoda diazo, în scopul imobilizării ei.**

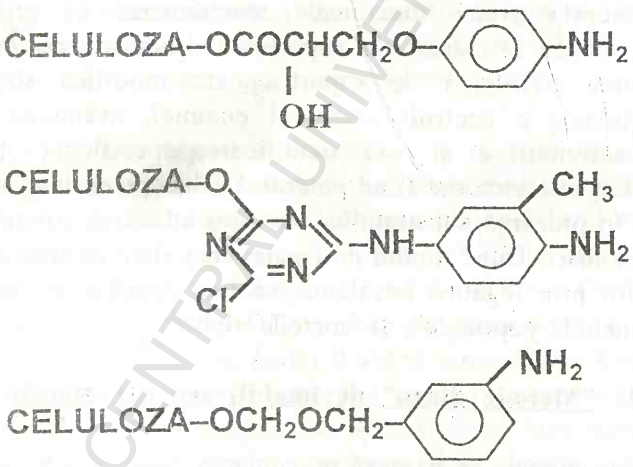


Fig. 7. **Derivați polizaharidici folosiți pentru cuplarea diazo a enzimelor**

Pentru imobilizarea tripsinei și pepsinei prin metoda diazo a fost utilizat compusul metilen-dianilino al amidonului. Acest compus a fost obținut prin condensarea dialdehido-amidonului cu p-diaminodifenilmetan (Fig. 8).

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

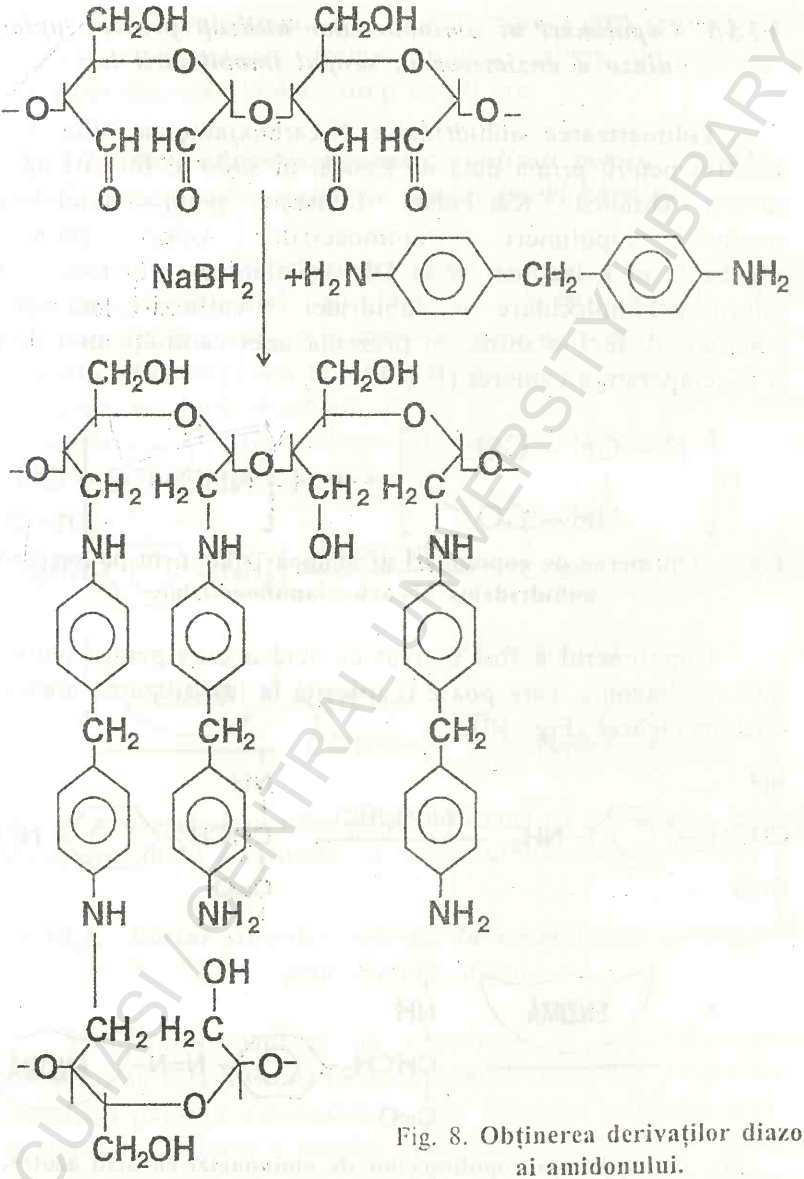


Fig. 8. Obținerea derivaților diazo ai amidonului.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.3.1.1 *Copolimeri ai aminoacizilor utilizați pentru cuplarea diazo a enzimelor în scopul imobilizării lor.*

Polimerizarea anhidridelor N-carboxiaminoacizilor a fost descrisă pentru prima dată de Leuch, în 1906 și folosită apoi în sinteza chimică. Katchalski folosește pentru imobilizarea enzimelor copolimeri ai aminoacizilor. Autorul obține un copolimer al L-leucinei și al DL-fenilalaninei prin reacția unei soluții echimoleculare a anhidridei N-carboxi-L-leucinei cu p-amino-DL-fenil-alanina, în prezența unei cantități mici de apă și la temperatura camerei (Fig. 9).

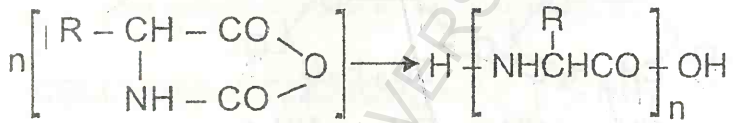


Fig. 9. **Obținerea de copolimeri ai aminoacizilor prin polimerizarea anhidridelor N-carboxiaminoacizilor.**

Copolimerul a fost activat cu acid azotos pentru obținerea sării de diazoniu, care poate fi folosită la imobilizarea ureazei și a ribonucleazei (Fig. 10).

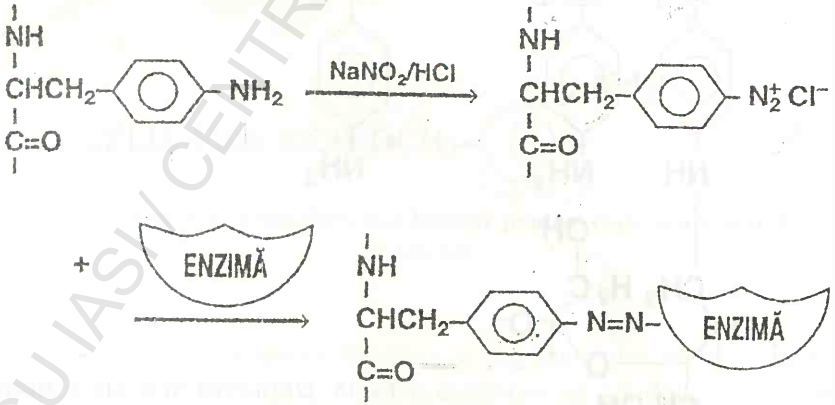


Fig. 10. **Activarea copolimerilor de aminoacizi cu acid azotos, urmată de cuplarea diazo a enzimelor**

Urează imobilizată cu activitate mare a fost obținută prin agitarea unui amestec format dintr-o soluție de urează și copolimer diazotat, la 4°C, timp de 20 ore.

1.3.1.2. *Derivați poliacrilamidici utilizați pentru cuplarea diazo a enzimelor în scopul imobilizării lor*

Derivații poliacrilamidici sunt cunoscuți sub numele comercial de Bio-Gel sau Enzacryl. Aceşti derivați amino aromatici pot fi cuplați prin metoda diazo, în scopul imobilizării enzimelor. Enzacryl AA este un derivat conținând grupări amino aromatice și după diazotare poate fi utilizat la imobilizarea aminoacilazei, a alfa-amilazei. Totuși se consideră că acest suport este relativ scump. (Fig. 11).

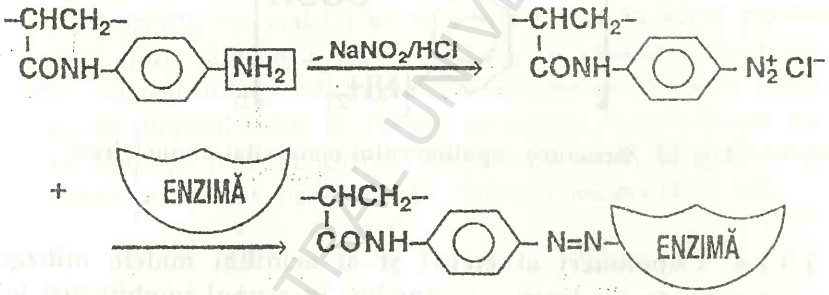


Fig. 11. **Activarea derivaților poliacrilamidici cu acid azotos, urmată de cuplarea diazo a enzimelor la compusul diazotat nou format.**

1.3.1.3. *Rășini stirenice folosite la imobilizarea enzimelor prin metoda diazo*

Poliaminostirenul şi un copolimer al metacrilat-aminostirenului au fost utilizați la imobilizarea enzimelor. Grubhofer a imobilizat pepsina, ribonucleaza prin folosirea poliaminostirenului diazotat. Autorul a umplut apoi coloane cu enzime imobilizate, cu care a reuşit realizarea unor reacții enzimatice continui.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structurile răşinilor utilizate sunt date în figurile 12 şi 13.

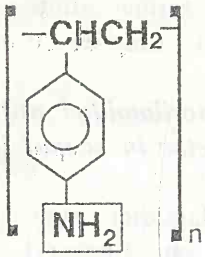


Fig. 12. **Structura poliaminostirenului**

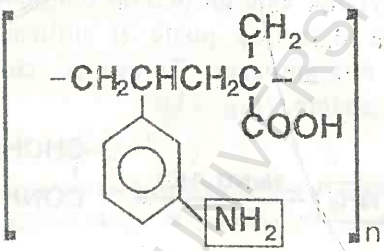


Fig. 13. **Structura copolimerului metacrilat-aminostiren**

1.3.1.4. Copolimeri ai etenei şi ai acidului maleic utilizaţi pentru cuplarea diazo a enzimelor, în scopul imobilizării lor

Goldstein foloseşte la imobilizarea enzimelor prin metoda diazo un derivat al copolimerului etenei cu acidul maleic şi anume derivatul diaminofenilen-metan, cu care reuşeşte să imobilizeze tripsina, papaina, alfa-chimiotripsina, subtilizina (Fig. 14, 15).

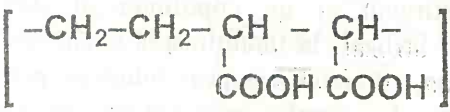


Fig. 14. **Structura copolimerului etenei şi a acidului maleic.**

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

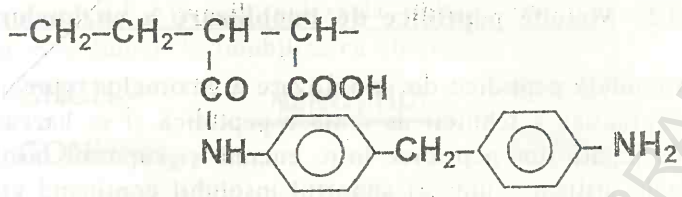


Fig. 15. **Structura derivatului diaminodifenilmetan al copolimerului etenei cu acidul maleic, care după diazotare poate fi folosit la cuplarea diazo a enzimelor în scopul imobilizării lor.**

1.3.1.5. *Derivați aminosilanici ai sticlei poroase folosiți la imobilizarea enzimelor prin metoda diazo*

Derivații aromatici aminosilanici ai sticlei poroase au fost folosiți la imobilizarea enzimelor de Weetall în același scop fiind folosiți și derivații diazotați.

Grupările aminoalchil au fost încorporate în sticla poroasă (G-OH), prin refluxarea sticlei poroase cu gamma-aminopropiltrietoxisilan în toluen. Sticla poroasă reacționează în urma procedeului de aminoalchilare cu clorura de benzoil. Prin reducere produsul trece în p-aminobenzoil. Acesta din urmă, prin diazotare formează un derivat diazoniu care cuplează enzima (Fig. 16).

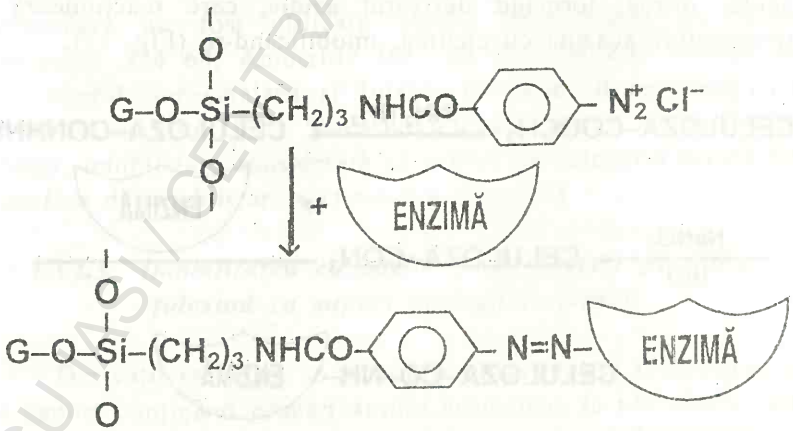


Fig. 16. **Imobilizarea enzimelor pe derivați ai sticlei poroase prin legături covalente de tip diazo**

1.3.2. Metode peptidice de imobilizare a enzimelor

Metodele peptidice de imobilizare a enzimelor reprezintă o aplicare practică a tehnicii de sinteza peptidică şi se bazează pe formarea legăturilor peptidice între enzimă şi suportul insolubil. Procedeele utilizate sunt: a) suportul insolubil conţinând grupări carboxil poate fi transformat în derivaţi reactivi azide, izocianaţi, anhidride, care reacţionează cu grupările amino libere ale enzimei, formând legături peptidice. b) prin folosirea unor reactivi de sinteză proteică cum sunt carbodiimida, Reactivul K al lui Woodward, legăturile peptidice formându-se fie între grupările amino ale enzimelor şi carboxil ale suportului insolubil, sau între grupările carboxil libere ale enzimelor şi grupările amino ale suportului insolubil.

1.3.2.1. *Imobilizarea enzimelor prin metode peptidice folosind ca suport derivaţi ai acidului azidic*

CM-celuloza este transformată în metilester şi apoi în hidrazidă, sub acţiunea hidrazinei. Hidrazida reacţionează cu acidul nitros, formând derivatul azidic, care reacţionează la temperatură scăzută cu enzima, imobilizând-o. (Fig. 17).

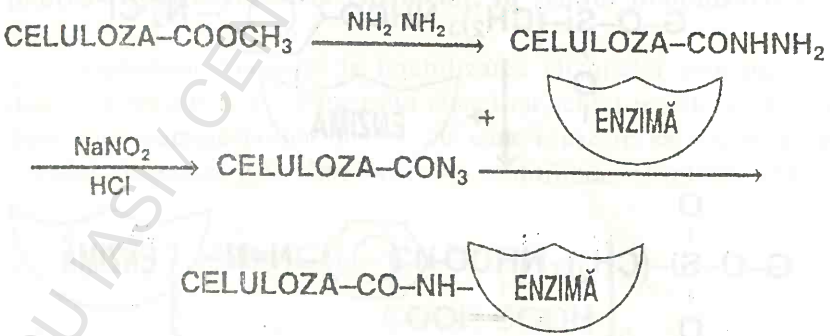


Fig. 17. **Obţinerea derivatului azidic al CM-celulozei, folosit la imobilizarea enzimelor prin legături peptidice.**

Enzacryl AH este hidrazida poliacrilamidei. Derivatul ei azidic este folosit la imobilizarea enzimelor (Fig. 18).

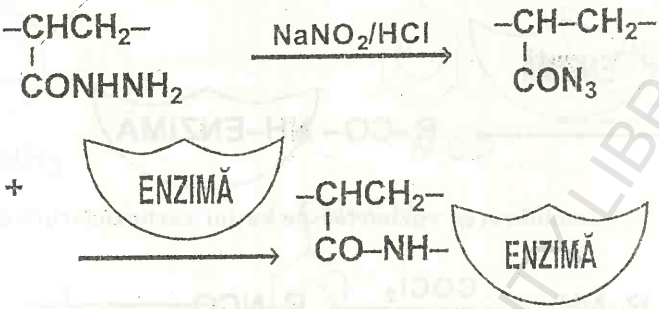


Fig. 18. **Obținerea derivatului azidic Enzacryl AH, folosit la imobilizarea enzimelor prin legături peptidice.**

1.3.2.2. *Imobilizarea enzimelor prin legături peptidice folosind ca suport rășini carboxiclorurice*

Rășinile carboxiclorurice preparate prin acțiunea clorura de tionil asupra rășinilor carboxilice acide, pot reacționa cu enzimele la temperatura scăzută, imobilizându-le. Ca rășini carboxilice au fost utilizate pentru imobilizarea enzimelor Amberlite XM 64, Amberlite IRC 50. Prin această metodă au fost imobilizate catalaza și lipaza. În 1956, Branderberger a folosit Amberlite IRC 50-carboxiclorura pentru imobilizarea lipazei, imobilizare considerată ca prima din categoria metodelor peptidice de imobilizare a enzimelor (Fig. 19).

1.3.2.3. *Imobilizarea enzimelor prin legături peptidice folosind ca suport derivați izocianat*

Derivații izocianat se pot obține prin reacția fosgenului cu un suport conținând grupări amino aromatice, la pH alcalin sau prin încălzirea unui suport care conține grupări acide azidice, cu acid clorhidric (Fig. 20).

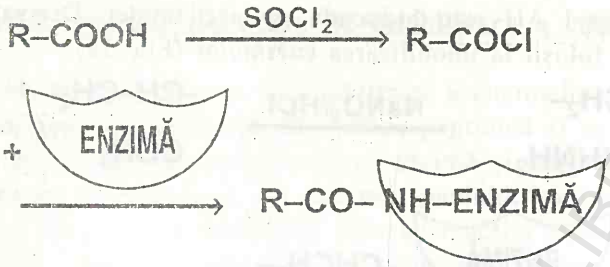


Fig. 19. **Imobilizarea enzimelor pe rășini carboxiclorurice.**

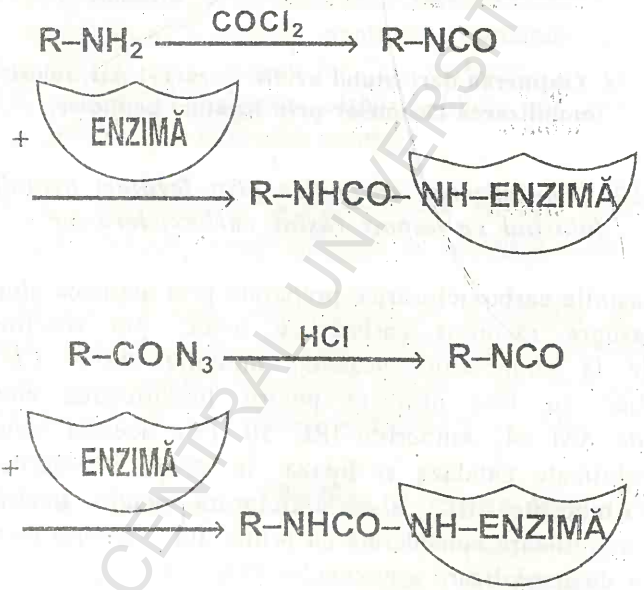


Fig. 20. **Posibilități de obținere a derivaților izocianat și folosirea lor la imobilizarea enzimelor.**

Au fost imobilizate prin această metodă catalaza, tripsina, alfachimotripsina. Ca suport insolubil au fost utilizate polizaharide de tipul Sephadex, CM-celuloza, poliaminostiren. De exemplu, derivații izocianat preparați prin reacția poliaminostirenului cu fosgenul au fost utilizați la imobilizarea catalazei (Fig. 21).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

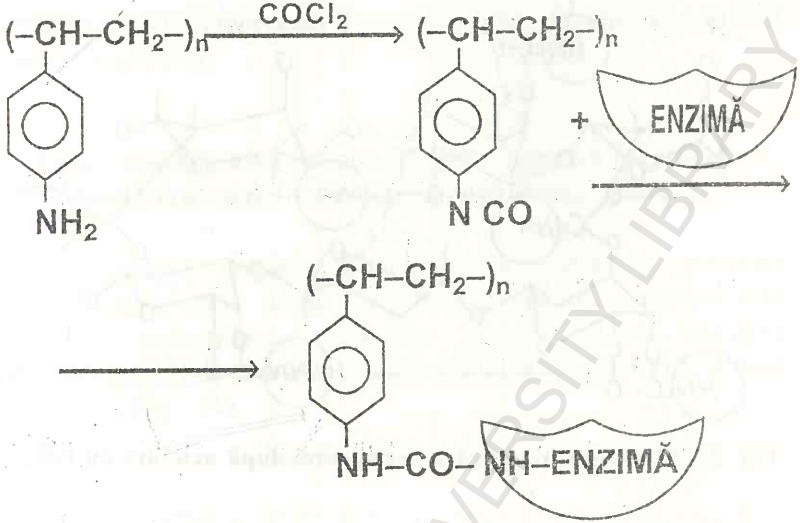


Fig. 21. **Obținerea derivaților izocianat ai poliaminostirenului și folosirea lor la imobilizarea enzimelor.**

1.3.2.4. Imobilizarea enzimelor prin legături peptidice folosind ca suport polizaharide activate cu BrCN

Activarea polizaharidelor cu BrCN a fost utilizată pentru prima dată de Axen, fiind în prezent folosită pentru imobilizarea unui mare număr de enzime. Această metodă presupune tratarea polizaharidului cu BrCN, când se formează un intermediar ciano reactiv. Intermediarul conduce la carbamatul inert și la imidocarbonat, care este reactiv (Fig. 22, 23).

Imidocarbonatul, specia activă, reacționează apoi cu gruparea amino liberă a enzimei, formându-se izoureea N-substituită și carbamat N-substituit. Această tehnică de imobilizare este simplă. Astfel, leucinaminopeptidaza legată de derivatul izocianat al fluorocromului a fost imobilizată folosind Sepharoxa activată cu BrCN. Imobilizarea leucinaminopeptidazei

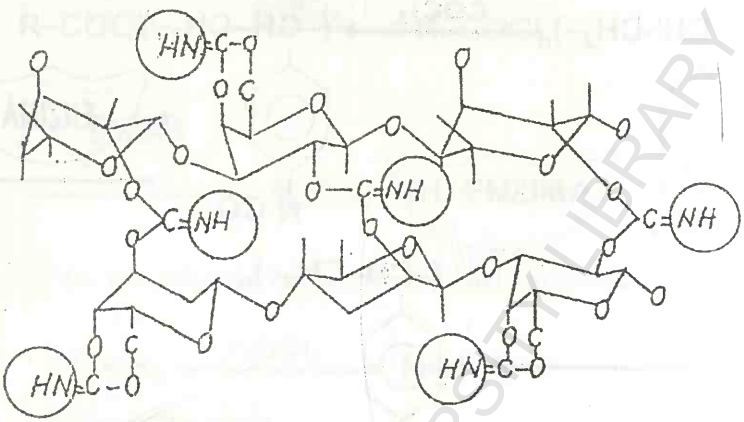


Fig. 22. Structura ipotetică a Sepharozei după activare cu BrCN.

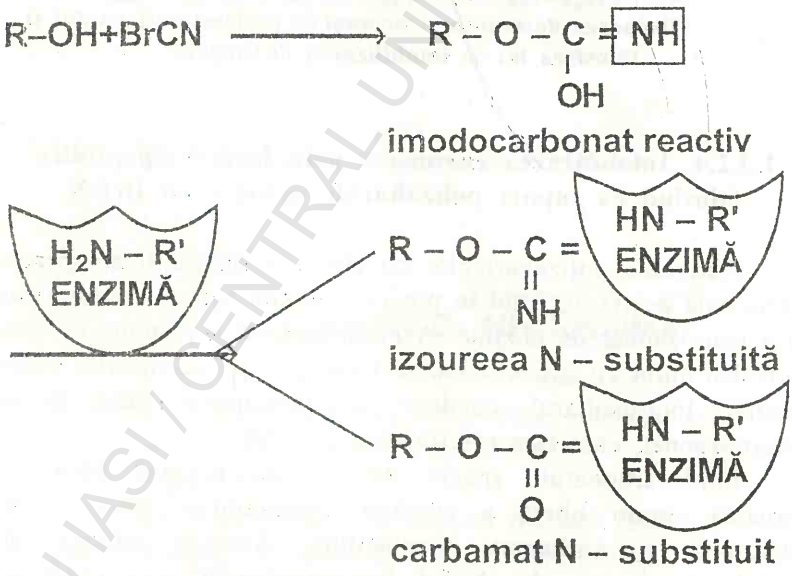


Fig. 23. Schema reacțiilor de cuplare a enzimei după activarea suportului polizaharidic cu BrCN.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fluorescente este importantă în vizualizarea distribuției enzimei în matricea gelului.

1.3.2.5. *Imobilizarea enzimelor prin legături peptidice folosind ca suport derivați ai anhidridei maleice*

Copolimerul anhidridei maleice cu etena, în prezența hexametilendiaminei, poate fi folosit pentru imobilizarea enzimelor. Imobilizarea enzimelor are loc prin formarea legăturilor peptidice între anhidrida maleică și grupările amino ale enzimei (Fig. 24).

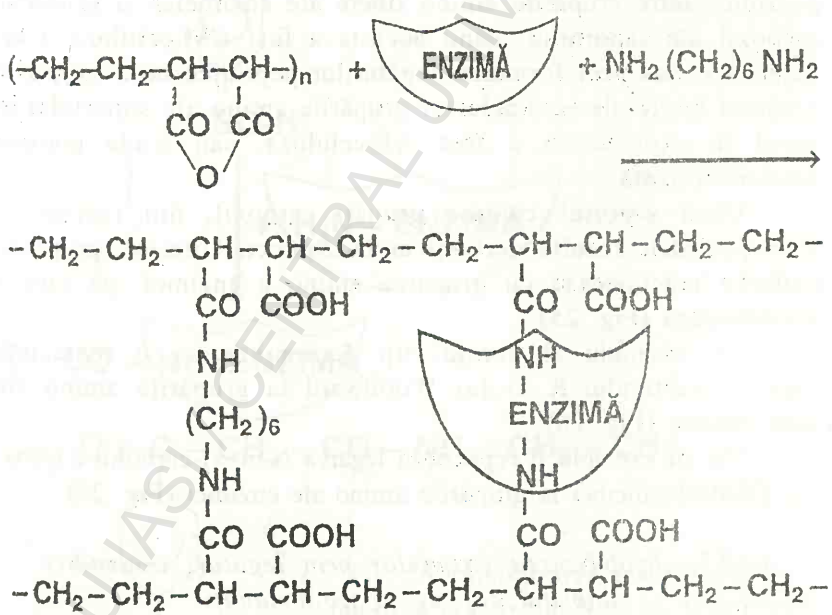


Fig. 24. **Imobilizarea enzimelor prin legături peptidice, folosind ca suport derivați ai anhidridei maleice.**

1.3.2.6. *Imobilizarea enzimelor prin legături peptidice folosind reactivi de condensare pentru legarea de suport*

Pentru imobilizarea enzimelor prin formarea de legături peptidice au fost folosiți reactivii carbodiimidici și reactivul K al lui Woodward. Suporturile utilizate frecvent au fost AE-celuloza, CM-celuloza, CM-Sephadex, copolimerul acrilamidei și al acidului acrilic, derivați aminosilanici ai sticlei poroase, copolimerul alaninei și al acidului glutamic, polimerii acidului aspartic, ai acidului galacturonic și ai acidului metacrilic. Prin acest procedeu au fost imobilizate alcool dehidrogenaza, aminoacilaza, acetilcolinesteraza, alfa-chimotripsina, glutamat dehidrogenaza, deoxiribonucleaza, leucinaminopeptidaza, peroxidaza, ureaza, tripsina.

Imobilizarea enzimelor are loc prin formarea legăturilor peptidice între grupările amino libere ale enzimelor și grupările carboxil ale suportului, când aceasta a fost CM-celuloza, CM-Sephadex, sau prin formarea legăturilor peptidice între grupările carboxil libere ale enzimelor și grupările amino ale suportului în cazul în care acesta a fost AE-celuloza, sau sticla poroasă aminosilanizată.

Când suportul conține grupări carboxil, din reacția cu carbodiimidele rezultă derivați ai O-izoureei. Ulterior, grupările carboxil reacționează cu gruparea amino a enzimei, pe care o imobilizează (Fig. 25).

Un exemplu al acestui tip de imobilizare o reprezintă legarea reactivului K al lui Woodward la grupările amino ale unei enzime (Fig. 26).

Un alt exemplu îl reprezintă legarea N-etoxi-carbonil-2-etoxi-1,2 dihidrokinoleinei la grupările amino ale enzimei (Fig. 27).

1.3.2.7. *Imobilizarea enzimelor prin legături tioamidice folosind ca suport izotiocianați.*

Principiul acestei metode este același cu cel al metodei care folosește derivați izocianat și se bazează pe formarea legăturilor

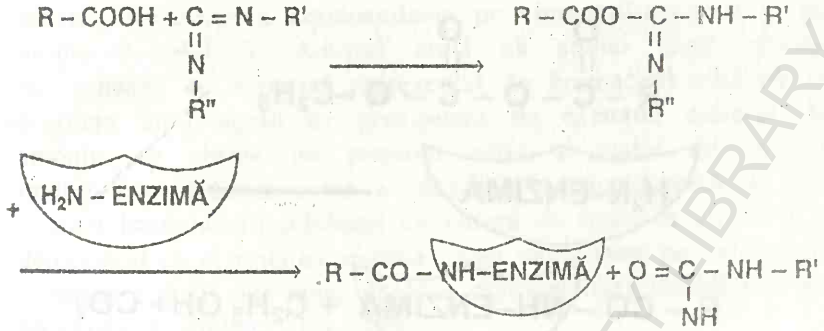


Fig. 25. Schema reacțiilor de imobilizare a enzimelor folosind ca agenți de condensare carbodiimide.

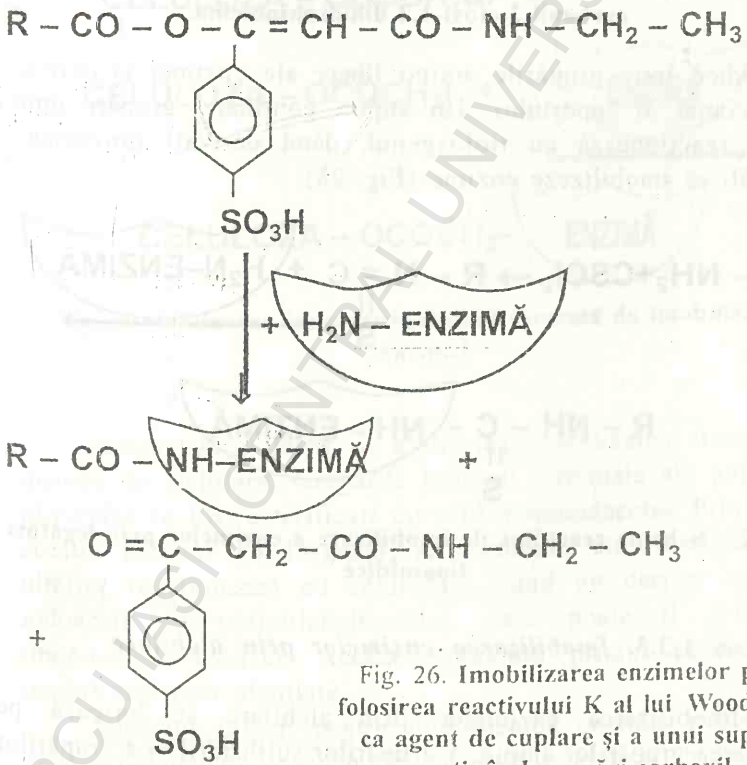


Fig. 26. Imobilizarea enzimelor prin folosirea reactivului K al lui Woodward ca agent de cuplare și a unui suport conținând grupări carboxil.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

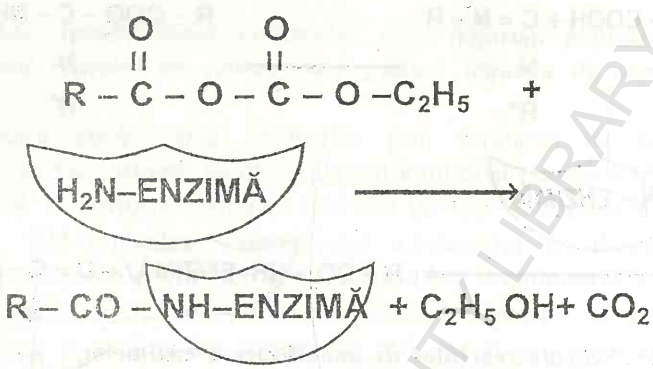


Fig. 27. **Imobilizarea enzimelor prin folosirea reactivului N-etoxi-carbonil-2-etoxi-1,2 dihidrokinoleina.**

tioamidice între grupările amino libere ale enzimei și derivații tioizocianat ai suportului. Un suport conținând grupări amino libere reacționează cu tiofosgenul, dând derivați tioizocianați capabili să imobilizeze enzime (Fig. 28).

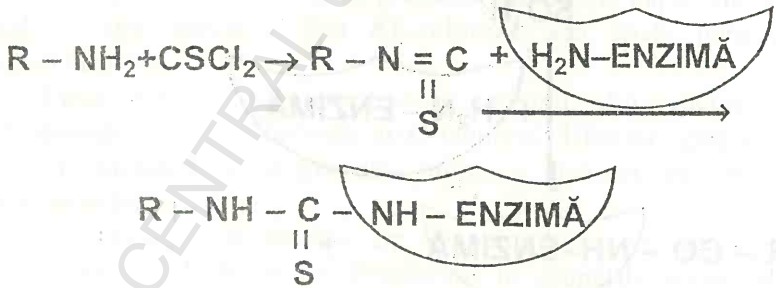


Fig. 28. **Schema reacțiilor de imobilizare a enzimelor prin legături tioamidice**

1.3.3. *Imobilizarea enzimelor prin alchilare*

Imobilizarea enzimelor prin alchilare se bazează pe alchilarea grupărilor amino, a grupărilor sulfhidril și a grupărilo fenol ale enzimei cu grupări reactive ale suportului. Chibat

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

descrie imobilizarea aminoacilazei pe cloracetil-celuloză și pe bromacetil-celuloză. Autorul arată că atunci când enzima reacționează cu suportul reprezentat de bromacetil-celuloză în prezența unui agent de precipitare de exemplu sulfatul de amoniu, se obține un preparat activ și stabil de enzimă imobilizată. Același autor a preparat iodoacetil-celuloză prin tratarea bromoacetil-celulozei cu iodura de sodiu în alcool și a demonstrat că activitatea aminoacilazei imobilizate pe iodoacetil-celuloză a fost mai mare decât a aminoacilizei imobilizate pe bromoacetil-celuloză (Fig. 29).

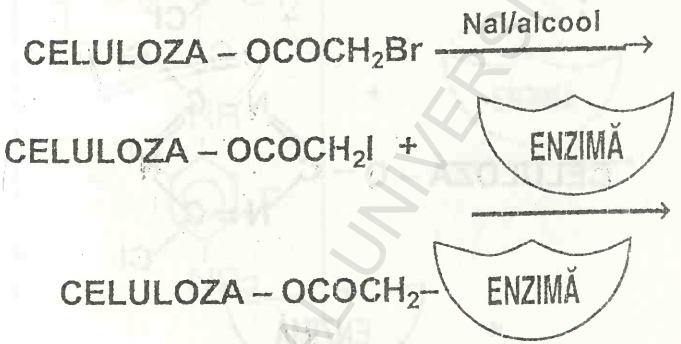


Fig. 29. **Obținerea iodoacetil-celulozei urmată de imobilizarea enzimei.**

Katchalski a reușit, de asemenea imobilizarea ureazei prin metode de alchilare. Grupările hidroxil terminale ale polietilenglicolului au fost esterificate cu acid monoiodacetic. Prin reacția acestui compus cu fosgenul, se formează cloroformiatul care ulterior reacționează cu celuloza, dând un derivat celulozic iodoacetil al polietilenglicolului, care poate fi folosit la imobilizarea ureazei. Acesta reprezintă primul procedeu de imobilizare prin alchilare.

Suportul folosit pentru imobilizarea enzimei poate fi un derivat halogenat, de exemplu cloroacetil-celuloză, bromoacetil-

celuloză, iodoacetil-celuloză, polietilenglicol-iodoacetil-celuloză, sau un derivat trianizil de tipul diclor-s-triazinil-celuloză, diclor-s-triazinil-Sephadex, diclor-s-triazinil-Sepharose precum și derivați halogenați ai polimetacrilatului. (Fig. 30).

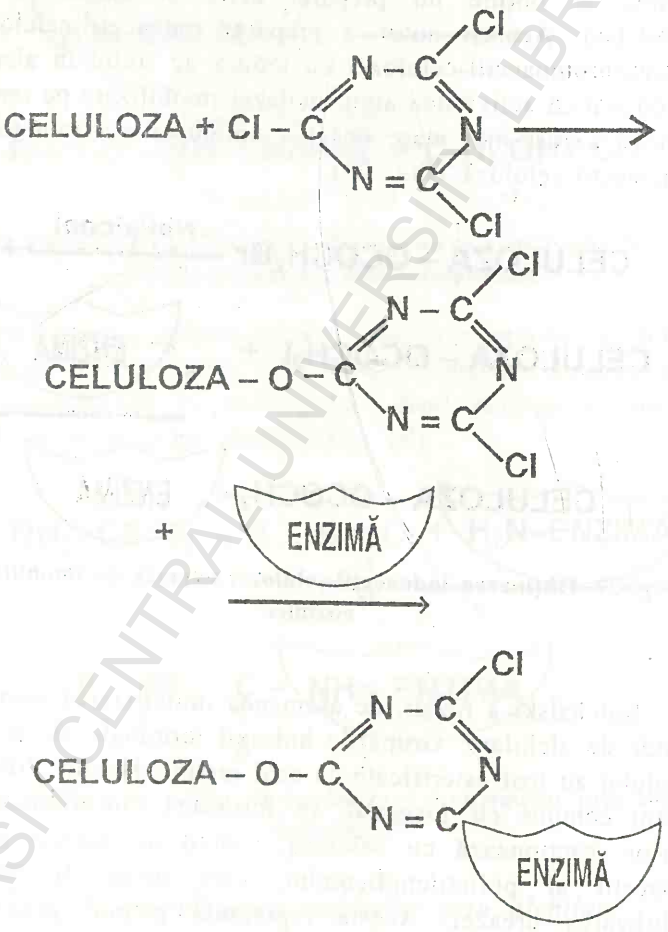


Fig. 30. Reprezentarea schematică a obținerii diclor-s-triazinil-celulozei, urmată de imobilizarea de enzime prin alchilare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior s-a dovedit că și copolimeri ai metacrilatului cu metacrilat-m-fluoro-dinitro-anilida pot fi utilizați pentru imobilizarea prin alchilare a invertazei, diastazei și a altor enzime (Fig. 31, 32).

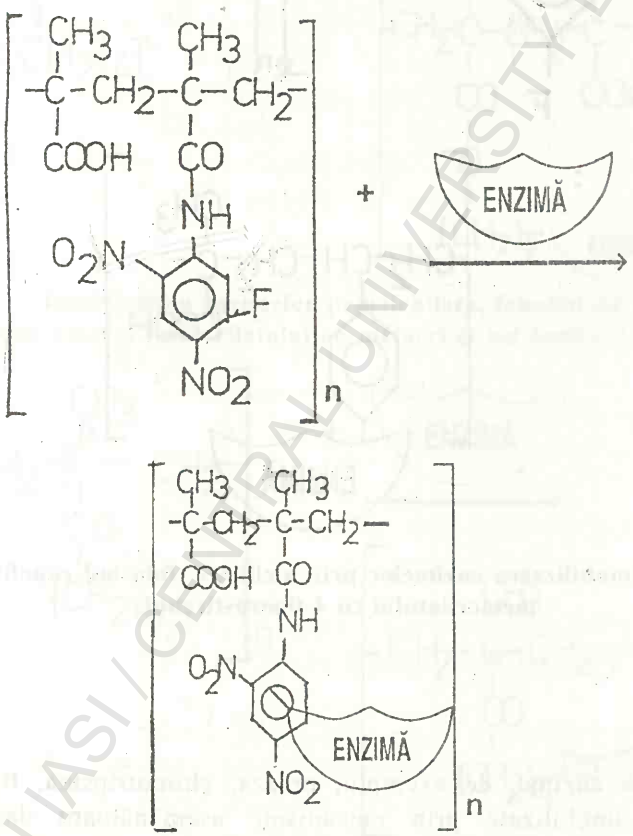


Fig. 31. **Imobilizarea enzimelor prin alchilare, folosind copolimerul metacrilatului cu metacrilat-m-flurodinitroanilida.**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

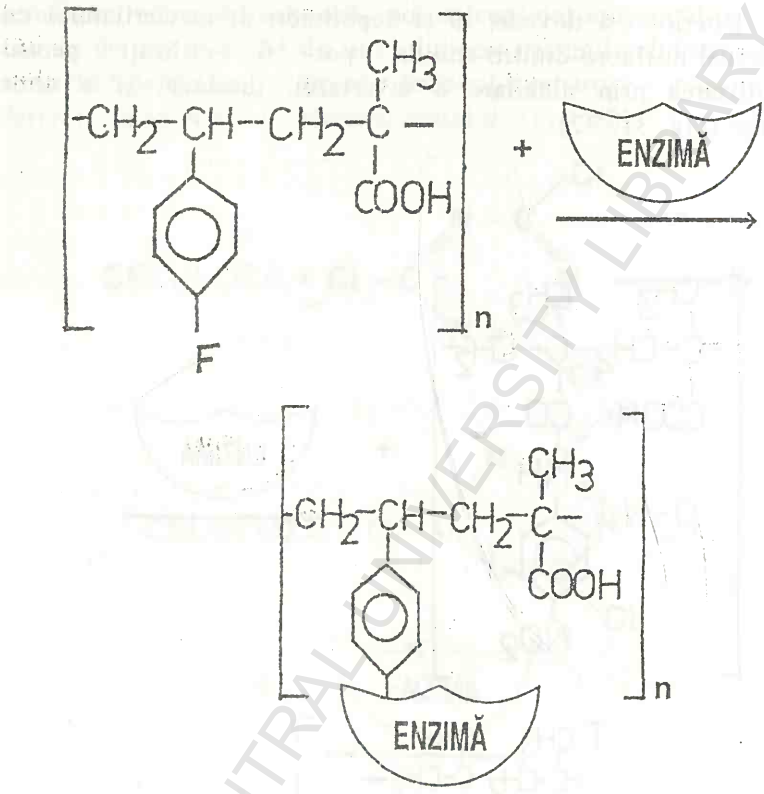


Fig. 32. **Imobilizarea enzimelor prin alchilare, folosind copolimerul metacrilatului cu 4-fluorostirenul.**

Alte enzime, de exemplu, ureaza, chimotripsina, tripsina au fost imobilizate prin mecanisme asemănătoare dacă se utilizează un copolimer al metacrilatului cu metacrilat-4-iod-butil-ester sau un homopolimer al metacrilat-4-iod-butil-ester (Fig. 33, 34)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

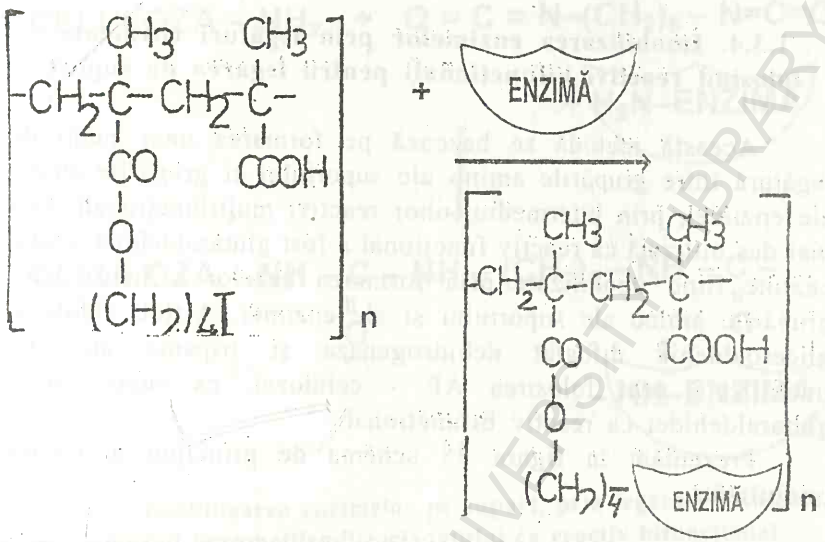


Fig. 33. **Imobilizarea enzimelor prinalchilare, folosind ca suport copolimerul metacrilatului cu metacrilat iod butil ester.**

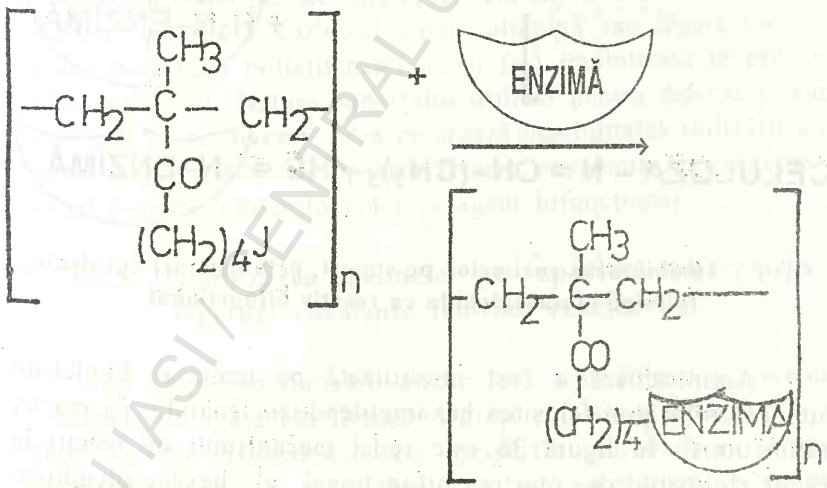


Fig. 34. **Imobilizarea enzimelor prin alchilare, folosind ca suport homopolimerul metacrilat-4-iod-butil-ester.**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.3.4. Imobilizarea enzimelor prin legături covalente, folosind reactivi bifuncționali pentru legarea de suport.

Această metodă se bazează pe formarea unor punți de legătură între grupările amino ale suportului și grupările amino ale enzimei, prin intermediul unor reactivi multifuncționali. Cea mai des utilizată ca reactiv funcțional a fost glutaraldehida, multe enzime fiind imobilizate prin formarea bazelor - Schiff între grupările amino ale suportului și ale enzimei. Astfel, aldolaza, gliceroaldehid difosfat dehidrogenaza și tripsina au fost imobilizate prin folosirea AE - celulozei, ca suport și a glutaraldehidei ca reactiv bifuncțional.

Prezentăm în figura 35 schema de principiu a acestei imobilizări.

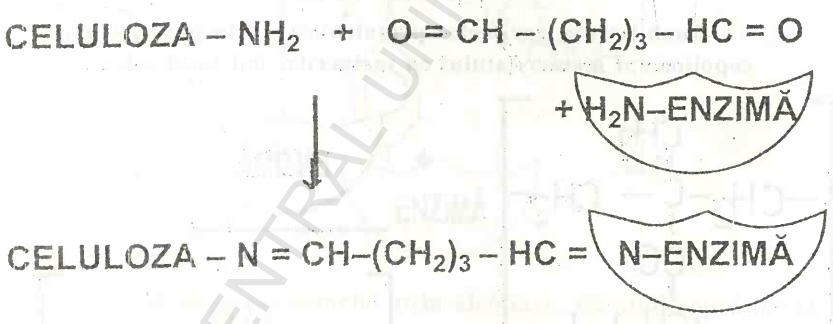


Fig. 35. **Imobilizarea enzimelor pe suport, prin legături covalente, folosind glutaraldehida ca reactiv bifuncțional.**

Aminoacilaza a fost imobilizată pe material Englehard aminoalchilat prin folosirea hexametilendiizocianatului ca reactiv bifuncțional. În figura 36 este redat mecanismul de reacții în cazul folosirii ca reactiv bifuncțional al hexametilendiizocianatului.

Este de asemenea posibilă tratarea cu glutaraldehidă a enzimelor adsorbite pe suporturi ce nu conțin grupări

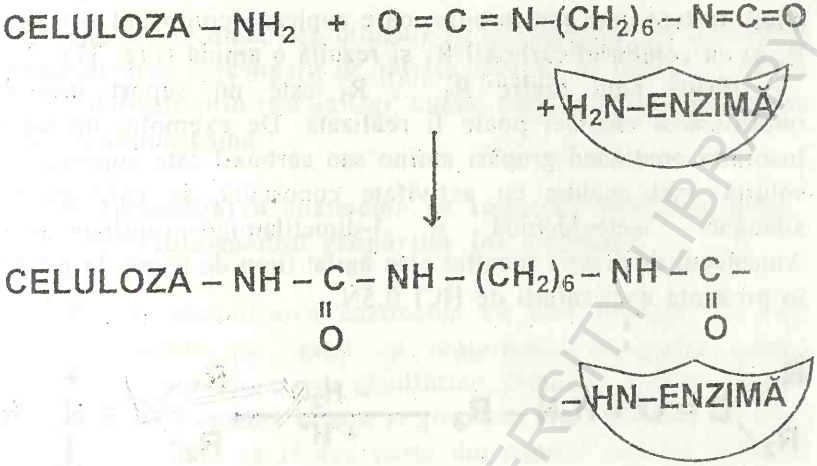


Fig. 36. **Imobilizarea enzimelor pe suport, prin legături covalente, folosind hexametilendiizocianatului ca reactiv bifuncțional.**

funcționale. Astfel, de exemplu, enzimele adsorbite fizic pe mărgele de sticlă, cărbune, silice, alumină sau legate ionic de silice tratată cu polietilenamină, au fost imobilizate în prezența glutaraldehidei. Natura suportului utilizat pentru diferite enzime este extrem de diversă, ceea ce crează posibilitatea utilizării unei game largi de procedee pentru fixarea covalentă a enzimelor în cazul folosirii glutaraldehidei ca agent bifuncțional.

1.3.5. Imobilizarea enzimelor pe suporturi solide, prin legături covalente folosind reacția Ugi.

În scopul imobilizării enzimelor s-au folosit și compuși izocianat, cu mare reactivitate. Ugi și colaboratorii au arătat că prin reacția izocianidei cu grupările carboxilice, amino, aldehidice, cetonice, se formează un substituent N-amidic. Mecanismul procesului de imobilizare constă în aceea că un compus amino-R_3 reacționează cu un compus carbonil-R_1, R_2

dând naștere unui ion imoniu, care cuplează compusul izocianat-R_4 și cu compusul carboxil-R_5 și rezultă o amidă (Fig. 37).

Dacă unul dintre R_1 ... R_5 este un suport insolubil imobilizarea enzimei poate fi realizată. De exemplu, un suport insolubil conținând grupări amino sau carboxil este amestecat cu soluția unei enzime cu activitate cunoscută, în care au fost adăugate acetoaldehida și 3-dimetilamino-propilizocianidă. Amestecul de reacție rezultat este agitat timp de 6 ore, la pH 6,5, în prezența unei soluții de HCl 0,5N.

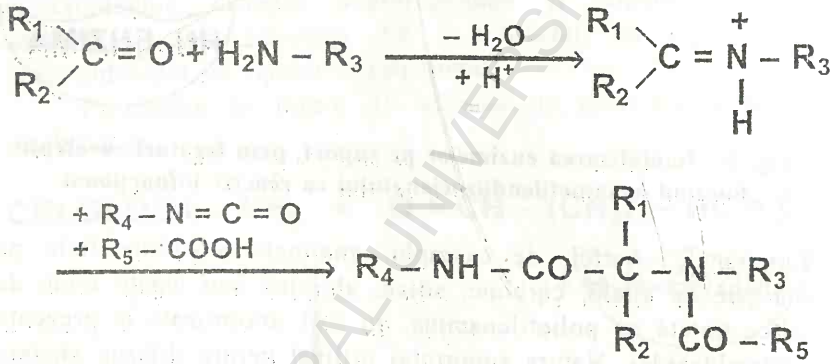


Fig. 37. **Imobilizarea enzimelor pe suport prin folosirea reacției Ugi.**

În calitate de suport în literatura de specialitate sunt menționate CM - Sephadex, CM - Sepharoza, derivați amino ai Sepharozei, AE - poliacrilamida, Enzacryl AA, poliizonitril-nylon, Enzacryl poliacetat.

Cuplarea enzimelor se realizează prin gruparile lor amino când suportul participă cu grupările lui carboxil, sau prin grupările carboxil ale enzimei, când suportul participă cu grupările lui amino. Au fost folosiți ca reactivi de cuplare perechile a) acetaldehida și 3-dimetilamino-propilizocianidă, b) acetaldehida și acidul acetic, c) acetaldehida și ciclohexilizocianida, d) glutaraldehida și ciclohexilizocianida.

Dintre enzimele larg utilizate în laboratoarele de biochimie pentru diverse investigații de interes teoretic și practic, care au fost imobilizate prin reacția Ugi, citãm; papaina, pepsina, tripsina și alfa-chimotripsina.

1.3.6. Imobilizarea enzimelor pe suportul disulfuric prin intermediul grupărilor lor sulfhidril.

Pentru imobilizarea enzimelor au fost folosite și alte procedee bazate pe faptul că majoritatea enzimelor conțin grupări tiol sau chiar punți disulfurice. Numărul acestor grupări variază de la o enzimă la alta și grupările tiol (resturile de Cys) sunt adesea citate ca făcând parte din centrul catalitic activ al enzimei, în timp ce punțile disulfurice conferă apoenzimei (sau enzimei) o anumită conformație moleculară.

Pregătirea suportului constă în tratarea acestuia cu disulfura de 2,2' - dipiridil. Este absolut necesar ca suportul să conțină grupari tiol libere. Enzima conținând și ea grupari sulfhidril libere se cuplează de suportul activat (Fig. 38).

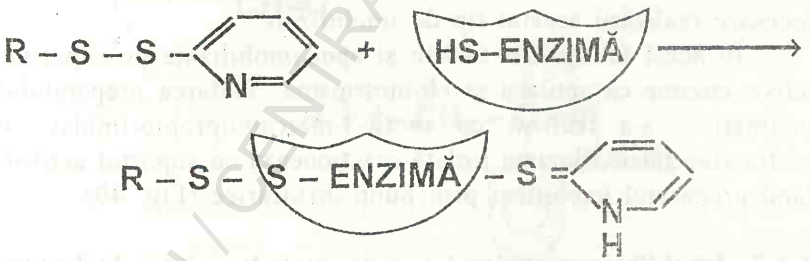


Fig. 38. **Imobilizarea enzimelor prin cuplarea lor prin intermediul grupărilor sulfhidril de un suport tio-activat.**

Au fost utilizați următorii derivați disulfurici ai suportului disulfură de agaroză-glutation-2-piridil cu numele comercial de Sepharoză tio activată, disulfură de agaroză-mercapto-hidroxil-propil-eter-2-piridil, disulfură de agaroză-acid adipic-acid

hidrazic-N-acetil-homocisteină-2-piridil, care s-au dovedit corespunzători (Fig. 39) pentru imobilizarea ureazei.

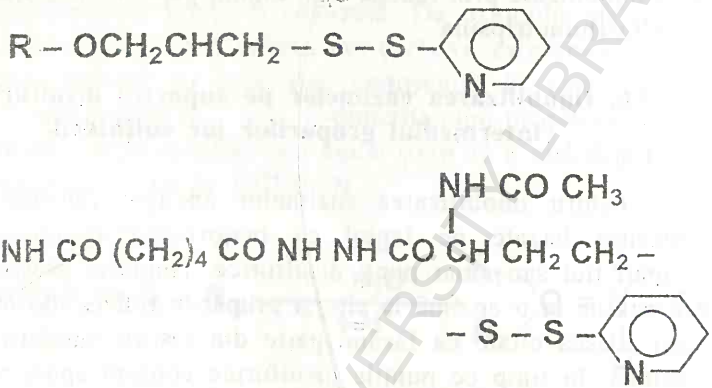


Fig. 39. **Reprezentarea schematică a formulelor unor compuși tioactivi, folosiți în imobilizarea enzimelor.**

O altă direcție în care s-au realizat cercetări a constat în posibilitatea tiolării enzimelor care nu conțin grupări sulfhidril necesare realizării acestui tip de imobilizare.

În acest fel au fost tiolate și apoi imobilizate pe suporturi active enzime ca amilaza și chimotripsina. Tiolarea preparatului enzimatic s-a realizat cu metil-3-mercaptopropio-imidat, în mediu slab bazic. Enzima tiolată reacționează cu suportul activat, dând preparatul imobilizat prin punți disulfurice (Fig. 40).

1.3.7. Imobilizarea enzimelor prin metode mixte de legare covalența de suport

Un exemplu al acestui tip de imobilizare îl reprezintă imobilizarea papainei, tripsinei, glucozoxidazei și invertazei. Suportul a fost reprezentat de amidon dialdehidic, obținut prin oxidarea amidonului cu acid periodic, sau de poli-4-formil-metoxifenol-metacrilat (Fig. 41).

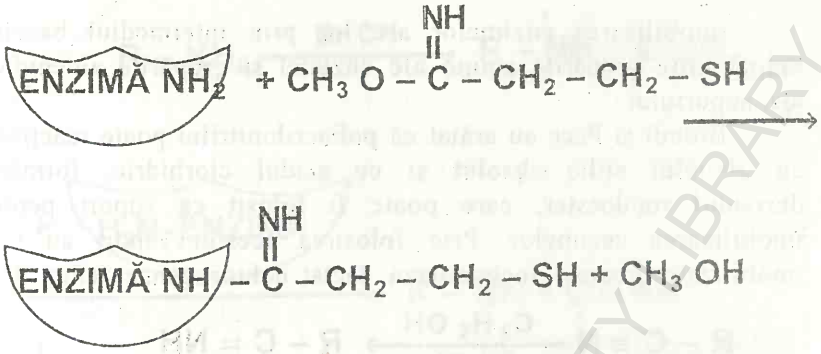


Fig. 40. Tiolarea enzimelor care nu conțin grupări tiol libere, în scopul imobilizării lor.

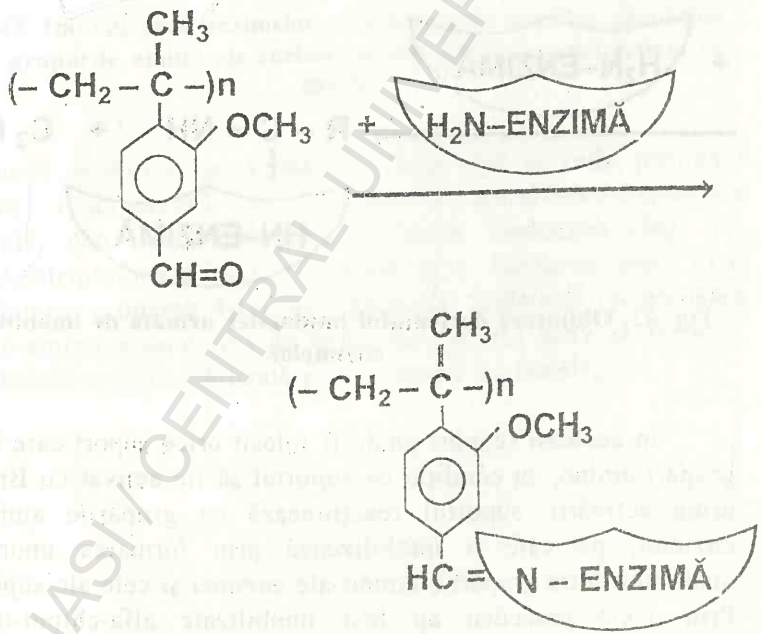


Fig. 41. Imobilizarea enzimelor pe poli-4-formil-metoxifenol-metacrilat.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Imobilizarea enzimelor are loc prin intermediul bazelor Schiff între grupările amino ale enzimei şi grupările aldehidice ale suportului.

Biondi şi Pace au arătat că poliacrilonitrilul poate reacţiona cu alcoolul etilic absolut şi cu acidul clorhidric, formând derivatul imidoester, care poate fi folosit ca suport pentru imobilizarea enzimelor. Prin folosirea acestui suport au fost imobilizate ureaza, glucoamilaza, lactat dehidrogenaza (Fig. 42).

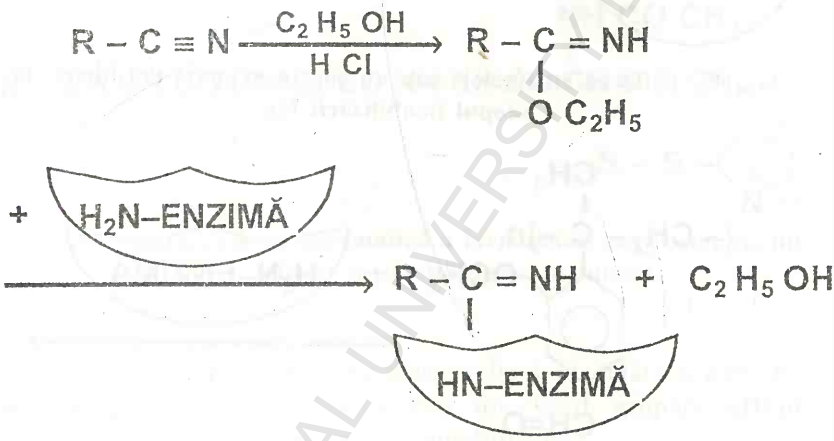


Fig. 42. **Obţinerea derivatului imidoester urmată de imobilizarea enzimelor.**

În aceleaşi scopuri poate fi folosit orice suport care conţine grupări amino, cu condiţia ca suportul să fie activat cu BrCN. În urma activării, suportul reacţionează cu grupările amino ale enzimei, pe care o imobilizează prin formarea unor punţi guanidino între grupările amino ale enzimei şi cele ale suportului. Prin acest procedeu au fost imobilizate alfa-chimo-tripsina, tripsina şi subtilizina (Fig. 43).

O altă metodă interesantă de imobilizare a enzimelor o reprezintă imobilizarea triptofanazei, care necesită piridoxal fosfatul în calitate de coenzimă, prin legarea apoenzimei la

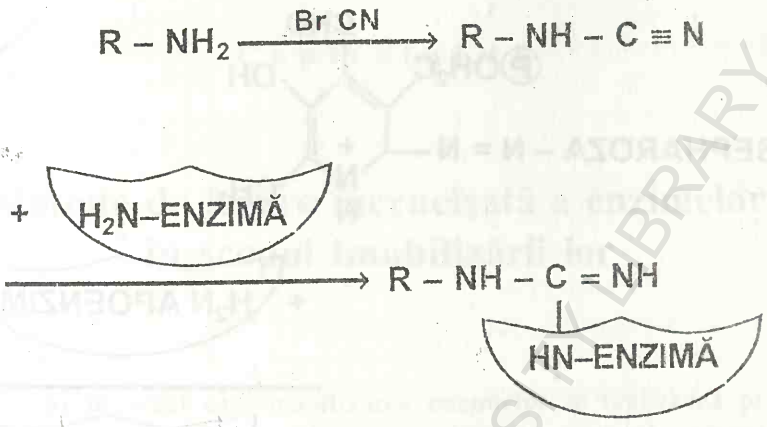


Fig. 43. **Imobilizarea enzimelor prin formarea punților guanidino între grupările amino ale enzimei și cele ale suportului activat cu BrCN.**

cofactorul imobilizat pe Sepharoză. După cum se vede, piridoxal fosfatul reacționează cu p-amino-benzamid-hexil-Sepharoza diazotată, dând derivatul piridoxal-fosfat Sepharoza (Fig. 44, 45). Apotriptofanaza a fost atașată prin formarea unei baze Schiff, între gruparea 4-formil a piridoxal fosfatului și gruparea epsilon-amino a unui rest de lizină din centrul activ al enzimei. Baza Schiff a fost stabilizată prin reducere cu $NaBH_4$.

BCU IAȘI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

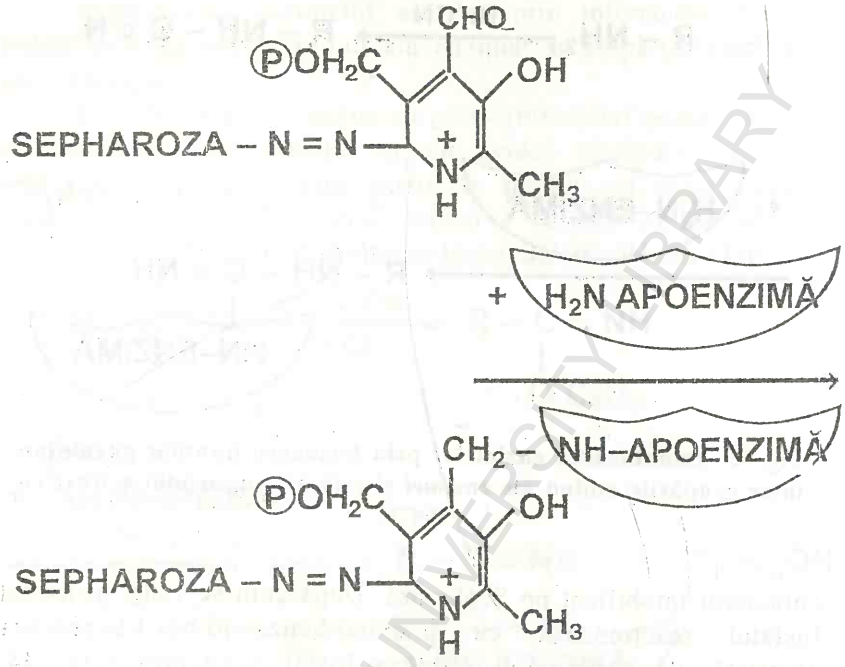


Fig. 44. **Imobilizarea cofactorului enzimatic urmată de imobilizarea enzimei.**

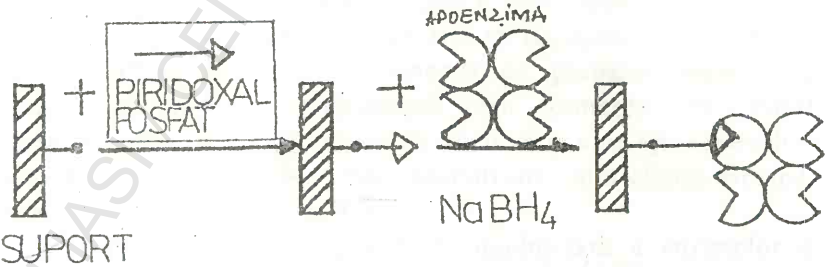


Fig. 45. **Imobilizarea triptofanazei**

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul II

Metode de legare încrucișată a enzimelor în scopul imobilizării lor

Și în acest caz imobilizarea enzimelor se realizează prin formarea de legături covalente, dar lipsește suportul, enzimele legându-se covalent una de alta. Imobilizarea se realizează în acest caz prin intermediul reactivilor bifuncționali sau prin intermediul reactivilor multifuncționali. În această calitate de reactiv bifuncțional a fost utilizată glutaraldehida, când legarea covalentă se realizează prin intermediul bazelor Schiff. Prin folosirea în același scop a derivaților izocianat, legarea se realizează prin legături peptidice. Bis-diazobenzidina realizează imobilizarea enzimelor prin cuplare diazo. Prin legături peptidice se realizează imobilizarea enzimelor când se folosește ca reactiv N,N'-etilen-bis-maleimida. Dacă se folosește ca reactiv de legare încrucișată N,N'-polimetilen-bis-iodoacetamida, imobilizarea enzimelor se realizează prin alchilare. Enzimele participă la formarea legăturilor covalente prin intermediul grupărilor amino terminale, grupărilor epsilon-amino ale resturilor de lizină, grupărilor fenol ale resturilor de tirozină, grupărilor tiol nemodificate ale resturilor de cisteină, și grupărilor imidazol ale resturilor de histidină.

Legarea încrucișată a enzimelor prin intermediul reactivilor bi- și multifuncționali se desfășoară în condiții de reacție mult mai severe decât în metodele de legare covalentă a enzimelor de un suport definit. Din această cauză se constată frecvent o diminuare accentuată a activității enzimatice în preparatul

BCU IAȘI - UMF LIBRARY

obținut, pe de o parte, datorită modificării configurației centrului catalitic activ al enzimei, iar pe de altă parte modificărilor conformaționale ale moleculei enzimatice survenite grație numeroaselor interacții dintre grupările chimice reactive ale resturilor de aminoacizi din structura enzimei.

Printre cei mai utilizați reactivi de legare încrucișată a enzimelor, în scopul imobilizării lor se numără glutaraldehida. Quiocho și Richards au tratat carboxipeptidaza A cu glutaraldehida și au obținut enzima imobilizată prin legături intermoleculare, acest procedeu stând la baza celei mai vechi metode de legare încrucișată a enzimelor în scopul imobilizării lor (Fig. 46).

Alfa-amilaza, alfa-chimotripsina și ribonucleaza au fost imobilizate prin folosirea hexametilendiizocianatului și a hexametilendiizotiocianatului ca reactivi de legare încrucișată (Fig. 47, 48).

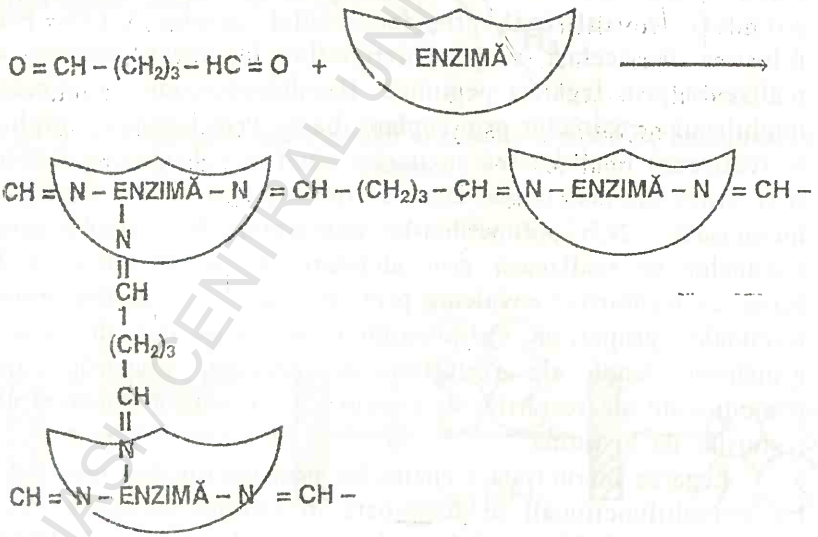


Fig. 46. Imobilizarea enzimelor prin legături încrucișate folosind glutaraldehida ca agent de legare.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

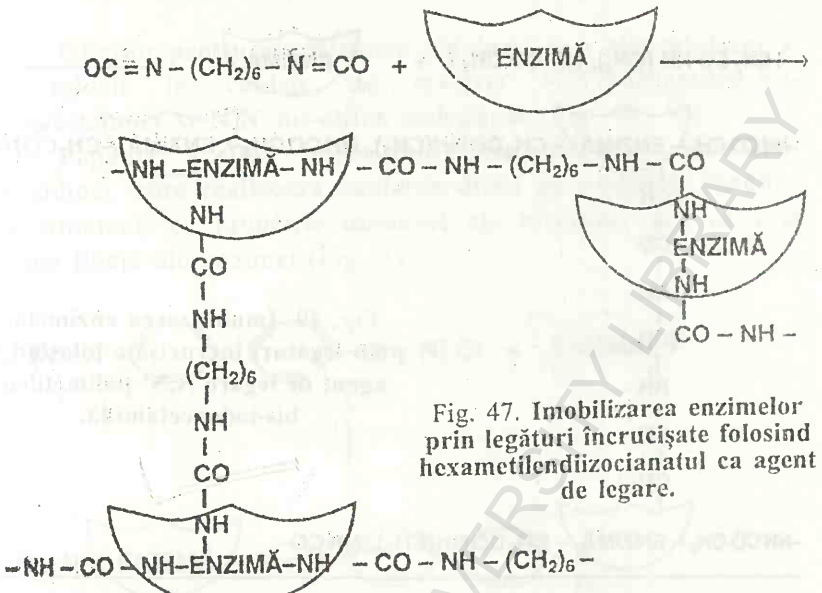


Fig. 47. **Imobilizarea enzimelor prin legături încrucișate folosind hexametilendiizocianatul ca agent de legare.**

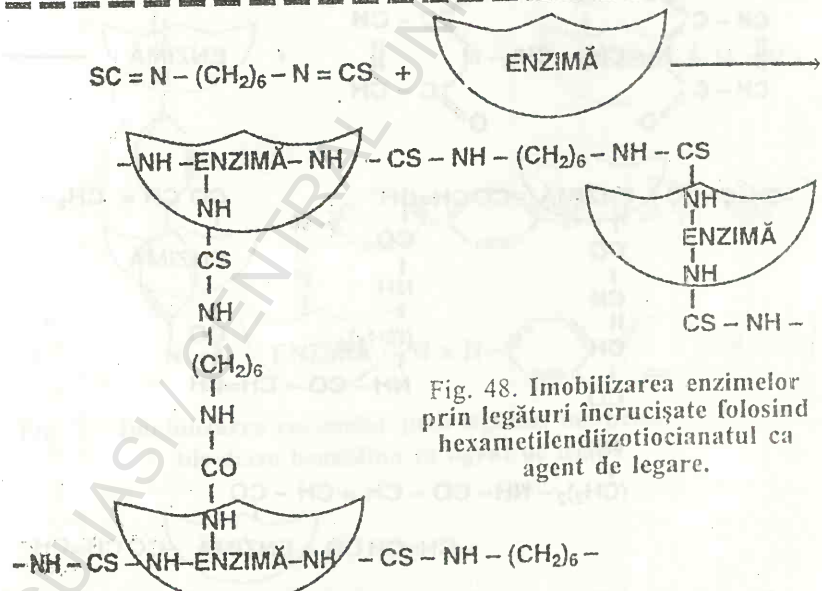


Fig. 48. **Imobilizarea enzimelor prin legături încrucișate folosind hexametilendiizotiocianatul ca agent de legare.**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

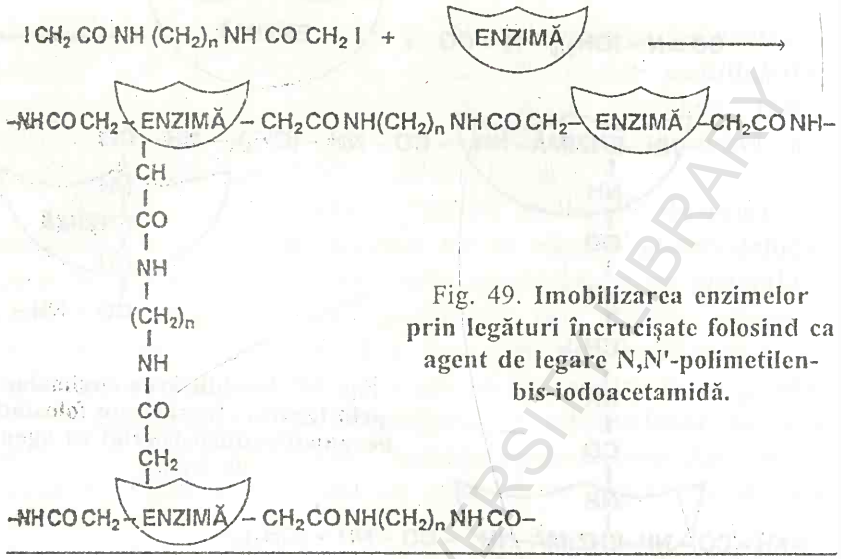

I CH2 CO NH (CH2)n NH CO CH2 I + ENZIMĂ
–NH CO CH2 – ENZIMĂ – CH2 CO NH(CH2)n NH CO CH2 – ENZIMĂ – CH2 CO NH–
CH
CO
NH
(CH2)n
NH
CO
CH2
–NH CO CH2 – ENZIMĂ – CH2 CO NH(CH2)n NH CO–

Fig. 49. **Imobilizarea enzimelor prin legături încrucișate folosind ca agent de legare N,N'-polimetilen-bis-iodoacetamidă.**

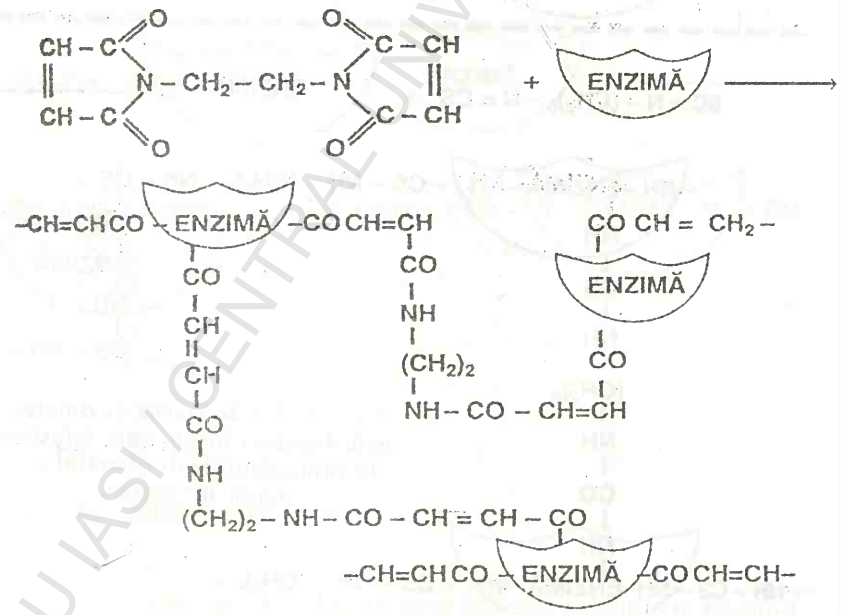


Fig. 50. **Imobilizarea enzimelor prin legături încrucișate folosind N,N'-bis-0 etilenmaleimida ca agent de legare.**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior pentru imobilizarea aldolazei şi a alfa-amilazei s-au folosit în calitate de reactivi N,N'-polimetilen-bis-iodoacetamidă şi N,N'-bis-etilen-maleimidă (Fig. 49, 50).

Papaina a fost imobilizată prin folosirea bis-diazo-benzidinei, care realizează cuplarea diazo cu grupările fenolice ale tirozinei, cu grupările imidazol ale histidinei sau cu cele amino libere ale enzimei (Fig. 51).

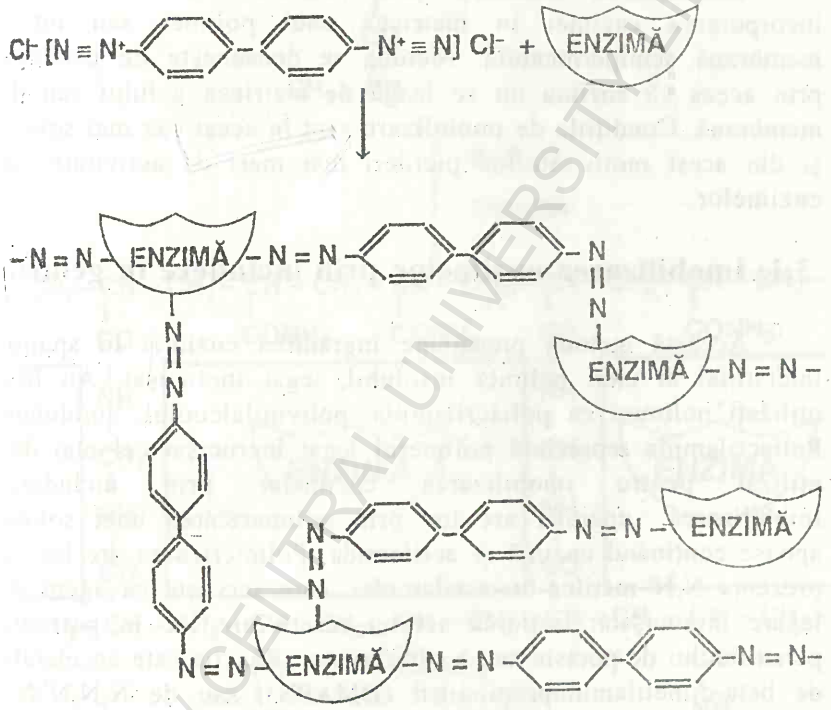


Fig. 51. **Imobilizarea enzimelor prin legături încrucişate folosind bis-diazo-benzidina ca agent de legare.**

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul III

Imobilizarea enzimelor prin incluziune.

Imobilizarea enzimelor prin incluziune se bazează pe încorporarea enzimei în matricea unui polimer sau într-o membrană semipermeabilă. Metoda se deosebește de celelalte prin aceea că enzima nu se leagă de matricea gelului sau de membrană. Condițiile de imobilizare sunt în acest caz mai severe și din acest motiv au loc pierderi mai mari de activitate ale enzimelor.

3.1. Imobilizarea enzimelor prin includere în geluri.

Această metodă presupune îngrădirea enzimei în spațiul interstițial al unui polimer insolubil, legat încrucișat. Au fost utilizați polimeri ca poliacrilamida, polivinilalcoolul, amidonul. Poliacrilamida reprezintă polimerul legat încrucișat cel mai des utilizat pentru imobilizarea enzimelor prin includere. Imobilizarea enzimei are loc prin polimerizarea unei soluții apoase conținând enzimă și acrilamidă. Polimerizarea are loc în prezența N,N'-metilen-bis-acrilamidei, care servește ca agent de legare încrucișată. Inițierea acestei reacții are loc în prezența persulfatului de potasiu sau a riboflavinei. Reacția este accelerată de beta-dimetilaminopropionitril (DMAPN), sau de N,N,N',N'-tetremetilendiamină (TEMED). Această tehnică a fost utilizată pentru prima dată de Bernfeld care a imobilizat tripsina, papaina, amilaza și ribonucleaza (Fig. 52). Chibata a studiat în detaliu condițiile de imobilizare a aminoacilazei, aspartazei, asparaginazei în geluri de poliacrilamidă, selecționând acele condiții care permit obținerea celor mai mari activități ale preparatelor imobilizate ca și a unei mari stabilități mecanice și

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

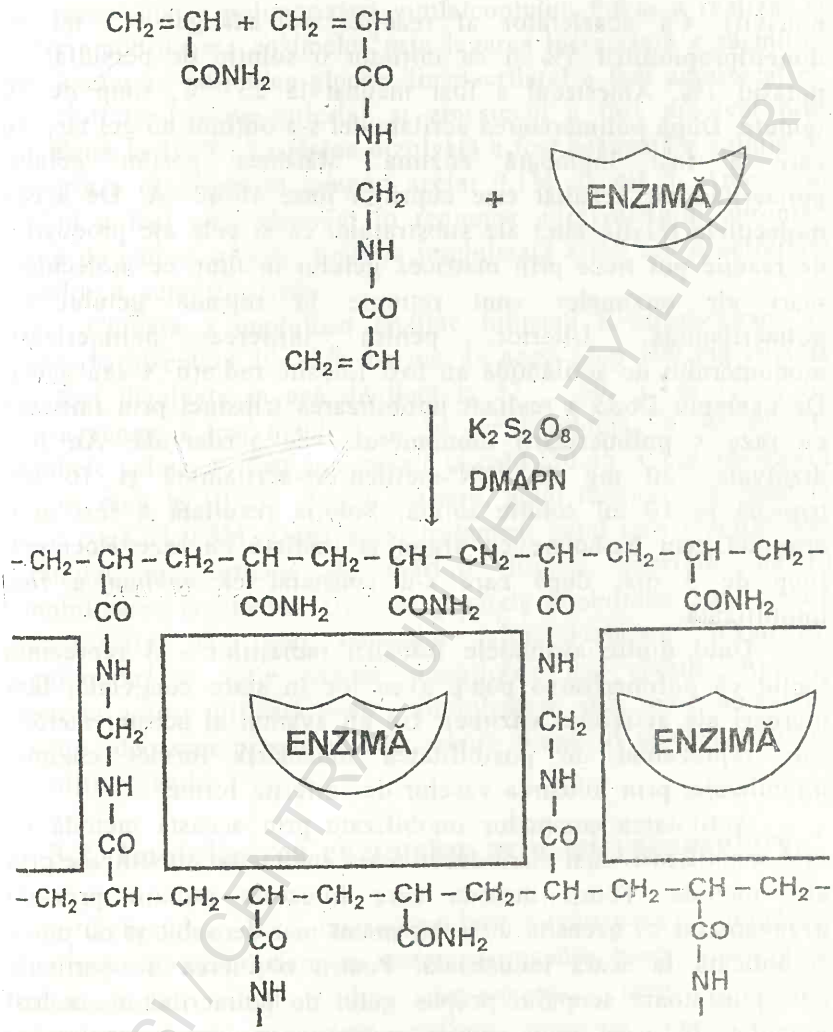


Fig. 52 **Imobilizarea enzimelor prin includere în geluri**

în timp. De exemplu, la o soluție conținând 750 mg acrilamidă monomer și 40 mg de N,N'-metilen-bis-acrilamidă, a fost adăugat 1 ml din soluția enzimei (enzimă dizolvată într-un tampon

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

potrivit). Ca accelerator al reacției s-a adăugat 0,5 ml de dimetilpropionitril 5% și ca inițiator o soluție de persulfat de potasiu 1%. Amestecul a fost incubat la 23 °C, timp de 10 minute. După polimerizarea acrilamidei s-a obținut un gel tare, în care a fost înglobată enzima. Mărimea porilor gelului poliacrilamidic rezultat este cuprinsă între 10-40 Å. De aceea moleculele relativ mici ale substratului ca și cele ale produșilor de reacție pot trece prin matricea gelului în timp ce moleculele mari ale enzimelor sunt reținute în rețeaua gelului de poliacrilamidă. Ulterior, pentru inițierea polimerizării monomerului de acrilamidă au fost folosite radiații X sau gama. De exemplu Dodo a realizat imobilizarea tripsinei prin inițierea cu raze x polimerizării monomerului de acrilamidă. Au fost dizolvate 120 mg de N,N'-metilen-bis-acrilamidă și 10 mg tripsină în 10 ml soluție salină. Soluția rezultată a fost apoi deaerată prin barbotare cu argon și iradiată cu raze Roentgen timp de 3 ore, după care s-a constatat că enzima a fost imobilizată.

Unul dintre avantajele folosirii radiațiilor - îl reprezintă faptul că polimerizarea poate avea loc în stare congelată, fără pierderi ale activității enzimei. Un alt avantaj al acestei metode este reprezentat de posibilitatea modelării formei enzimei imobilizate, prin folosirea vaselor de diferite forme.

Activitatea enzimelor imobilizate prin această metodă nu este semnificativ mai mare decât cea a enzimelor imobilizate prin alte metode. Totuși metoda care folosește radiații prezintă dezavantajul că necesită un echipament mai deosebit și nu poate fi aplicată la scară industrială. Pentru obținerea de particule corespunzătoare scopului propus gelul de poliacrilamida a fost granulat. În acest scop soluția apoasă care conține enzima și monomerul a fost dispersată într-o fază hidrofobă, formată din toluen și cloroform și apoi polimerizată în atmosferă de azot, rezultând mărgele sferice bine definite.

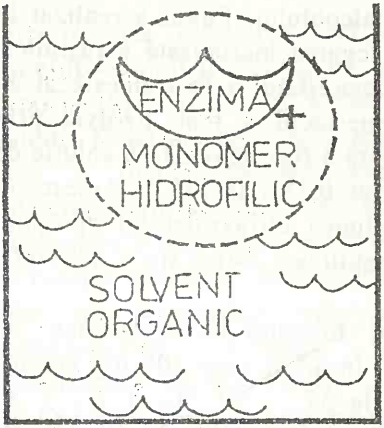
Glucoamilaza și invertaza au fost imobilizate prin inițierea

cu raze gama a polimerizării vinilalcoolului. Fukui a realizat în 1976 imobilizarea enzimelor prin legarea încrucișată a rășinilor. De exemplu, polietilen-glucon-dimetacrilatul a fost amestecat cu un inițiator-benzoin-etilester și amestecul a fost dizolvat prin încălzire la 50 °C. La rășina dizolvată a fost adăugată o soluție de invertaza dizolvată în tampon acetat 0,1M, la pH 5. Amestecul lichid a fost apoi iluminat în regiunea ultravioletului apropiat, timp de câteva minute. Enzima imobilizată astfel are o activitate catalitică semnificativă.

Chibata a imobilizat enzime folosind K-carrageenan, un polizaharid extras din alge marine. În acest scop 100 mg enzimă au fost dizolvate în apă distilată la 37 ... 50 °C și 1,7 g K-carrageenan a fost dizolvat în 34 ser fiziologic, la 40...60 °C Ambele soluții au fost amestecate la cald (30-35 °C) și amestecul a fost răcit la 10 °C. Pentru întărire, gelul rezultat este udat la rece cu KCl 0,3M. După acest tratament gelul tare rezultat este granulat în particule de mărimi diferite, potrivite pentru imobilizarea enzimelor. Dacă preparatele imobilizate sunt tratate cu reactivi de tipul taninului, glutaraldehidei, hexametil-endiamidei se obțin enzime imobilizate mai stabile. Aceasta metoda a fost utilizată pentru imobilizarea unui mare număr de enzime deoarece procedeul este relativ simplu și se desfașoară în condiții blânde.

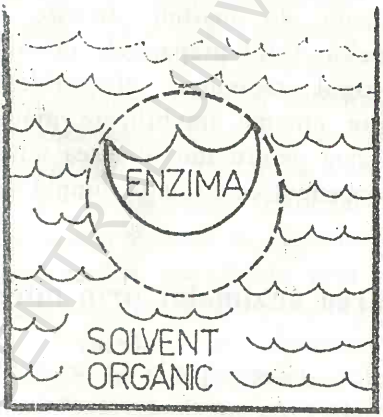
3.2. Imobilizarea enzimelor prin microcapsulare.

Tehnicile de microcapsulare realizează includerea enzimelor în microsfere cu pereți permeabili pentru substrat și produs de reacție, dar impermeabil pentru enzimă. Microcapsularea se poate realiza printr-un procedeu de polimerizare interfacială. Prin polimerizare interfacială se înțelege sinteza unui copolimer insolubil în apă, la suprafața picăturii. În proces sunt implicați doi comonomeri, unul care este solubil numai în faza organică, iar celălalt care este solubil atât



1. EMULSIONARE

2. POLIMERIZARE INTERFACIALĂ



3. ÎNDEPĂRTAREA MONOMERULUI CARE NU A REACȚIONAT

Fig. 53 Imobilizarea enzimelor prin polimerizare interfacială.

BCU IAȘI / CENTRU UNIVERSITAR IBRAR

în faza organică cât și în apă. Așadar metodele bazate pe procedeul de polimerizare interfacială reprezintă o aplicare a principiului că monomerii hidrofobi și hidrofili polimerizează la interfață.

Procedura constă mai întâi în emulsionarea soluției conținând un monomer și enzimă, în soluția unui solvent organic, insolubil în apă. Apoi sub agitare continuă este adăugată soluția într-un solvent organic a monomerului care este insolubil în apă. Polimerizarea celor doi monomeri are loc la interfața dintre faza apoasă și faza organică a emulsiei. În acest fel, enzimele din faza apoasă sunt închise în membrana unui polimer. Monomerii utilizați fie polimerizează, fie policondensează. Componenții utilizați hidrofilici au fost: polifenoli, poliamine, glicol. Componenta hidrofobică a fost reprezentată de poliizocianați, bishaloformiați etc. În figura 53 este reprezentată schematic procedura de obținere de microcapsule, prin polimerizare interfacială. Dimensiunile capsulelor pot fi ajustate.

În ceea ce privește activitatea enzimelor imobilizate, se constată o diminuare a acesteia. Chang imobilizează prin acest procedeu enzime ca asparaginaza, ureaza, anhidraza carbonică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul IV

4.1. Caracterizarea generală a glucozoxidazei

Glucozoxidaza face parte din clasa oxidoreductazelor, având codul EC1.1.3.4. şi denumirea sistemică beta-D-glucozo: oxigen oxidoreductaza (167) şi catalizează reacţia (Fig. 54).

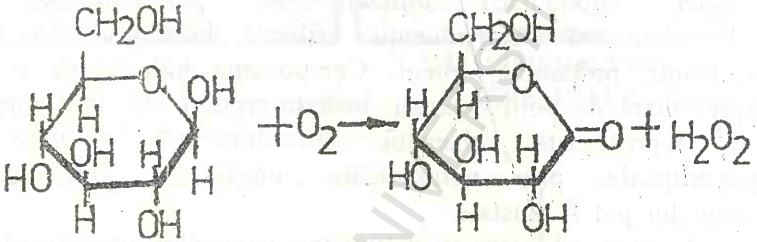


Fig. 54 **Reacţia catalizată de glucozoxidaza.**

Glucozoxidaza de natură fungică este o flavoproteină, având doi moli de flavinadenindinucleotid (grupare prostetică) per mol enzimă. Pentru reacţia catalizată de glucozoxidaza, Meiattini a propus mecanismul redat în figura 55. Deci folosind ca acceptor un cromogen, reacţia poate fi detectată prin metode spectrofotometrice. Acceptorii cromogeni trebuiesc selectaţi cu atenţie, luându-se în considerare potenţialul lor redox. Printre cromogenii care pot fi folosiţi enumerăm orto-dianizidina şi orto-toluidina, care prezintă dezavantajul că se decolorează relativ repede, orto-fenilendiamina care este însă instabilă, guiacolul care este puţin solubil, fenolftaleina care este instabilă, ABTS (2, 2'-azinodialfa-acetil-benztialozin-sulfonat), ferocianura care însă dă reacţii secundare cu bilirubina şi 4-aminoantipirina. Indiferent de cromogenul ales, reacţia este

BCU "I.S." CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ETAPA I-a

$$\beta - D - GLUCOZA \xrightarrow{GLUCOZOXIDAZA} \gamma - D - GLUCONOLACTONA + H_2O$$

$$FAD \rightleftharpoons FADH_2$$

$$O_2 \longrightarrow H_2O_2$$

ETAPA a II-a

$$ACCEPTOR\ REDUS + H_2O \xrightarrow{PEROXIDAZA} ACCEPTOR\ OXIDAT + H_2O$$

Fig. 55. **Principiul metodelor de determinare a activității glucozoxidazei pe baza estimării concentrației de apă oxigenată, rezultată din reacție.**

detectată pe baza estimării cantității de apă oxigenată eliberată în timpul reacției. Barton folosește drept cromogen ortodianizidina. Densitatea optică a eșantioanelor este citită la 525 nm.

Glucozoxidaza a fost izolată pentru prima dată de Müller, din *Aspergillus niger*. Alți autori au obținut preparate purificate de glucozoxidoza din diferite tipuri de *Penicillum*. Glucozoxidaza de uz comercial se obține din culturile de Aspergillus niger, cultivate în biofermentatoare, în principal pentru producerea de acid gluconic sau de gluconați. În acest caz glucozoxidaza este obținută ca un coprodus al gluconatului. Glucozoxidaza produsă de *Aspergillus niger* este localizată intracelular, fiind eliberată din miceliul ciupercii prin liza celulelor acestuia. Pentru obținerea enzimei sub formă lichidă

BUJAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sau solidă, miceliul de Aspergillus niger se separă din mediul de cultură, se dezintegrează mecanic sau prin autoliză şi poate fi separată de resturile celulare şi de alte substanţe de balast, coprezente în mediu, prin filtrare sau prin centrifugare.

După trecere prin una sau mai multe trepte de purificare, enzima este precipitată din soluţia ei apoasă prin adăugarea unui solvent miscibil cu apa, ca etanolul, acetona sau metanolul 58%, la valori de pH cuprinse între 6,5 - 7,5, la temperaturi care nu depăşesc 19–21 °C. Glucozoxidaza care în condiţiile de mai sus precipită, se separă prin filtrare sau centrifugare. Sedimentul rezultat se aduce la sec, se dizolvă într-o soluţie tampon adecvată, se standardizează şi i se adaugă stabilizatori. Soluţia finală trebuie să fie limpede şi este stabilă timp de mai mulţi ani, la rece (–20 °C); ea îşi păstrează activitatea câteva luni dacă este conservată la temperatura camerei. De obicei se comercializează preparate solide, deşi se pare că stabilitatea soluţiilor apoase este mai mare decât a preparatelor uscate.

Biosinteza glucozoxidazei realizată de diferite microorganisme cultivate în biofermentatoare este însoţită de biosinteza catalazei, a cărei activitate poate fi uşor evidenţiată în preparatele de glucozoxidază cu un factor de purificare mic. Din această cauză, purificarea glucozoxidazei din miceliile de ***Aspergillus niger*** presupune în mod obligatoriu îndepărtarea catalazei. Preparatele de glucozoxidază care nu conţin catalază au o activitate de peste 250 unităţi/mg proteină, activitatea catalazică fiind mai mică de 0,1 unităţi/mg proteină.

Stark propune o metodă de purificare a glucozoxidazei, bazată pe precipitarea acesteia cu sărurile solubile în apă ale bazelor acridinice, preferabil diamino-etoxi-acridin-lactatul. Preparatul obţinut prin precipitare este supus cromatografiei pe un schimbător de ioni acid, apoi pe unul bazic. Eficienţi s-au dovedit a fi schimbătorii de cationi de tipul Sephadex C-50, cu grupă sulfoetil funcţionale şi schimbători de anioni de tipul DEAE - Sephadex A - 50, cu grupările diaminoetil funcţionale.

Svoboda a purificat glucozoxidaza din *Aspergillus niger* prin cromatografiere pe Amberlite CG-50 și pe DEAE-celuloză. După trecerea pe coloană, preparatul enzimatic a fost concentrat prin precipitare fracțională cu sulfat de amoniu, operația fiind urmată în mod obligatoriu de dializă.

Nakamura și Fuji au purificat glucozoxidaza prin tratarea filtratului brut cu Bio-Gel P-150. Prin această operație autorii îndepărtează din filtrat catalaza. Filtratul rezultat are o activitate glucozoxidazică mare și este fracționat în continuare cu sulfat de amoniu de concentrație 55 - 85%. După reluarea precipitatului într-un volum redus de tampon și dializare în prezența apei bidistilate, soluția de enzimă se trece pe coloana de Amberlit CG-50. Raportul densităților optice măsurate de 382 nm pentru preparatul de glucozoxidază purificată este de 0,93.

Tsuge utilizează pentru purificarea glucozoxidazei coloane de DEAE - celuloză și Sephadex - 200, în timp de Krause folosește în același scop coloane de Sephadex G - 150 și Bio - Gel P - 300, activitatea glucozoxidazei obținute fiind de 100 unități/mg. Bergmayer purifică glucozoxidaza din *Aspergillus niger* prin precipitare cu metanol de concentrație 61%, obținând un factor de purificare de 29.

Glucozoxidaza din *Aspergillus niger* este formată din două subunități glicopolipeptidice identice, de 80.000 D fiecare, legate covalent prin legături disulfurice. Glucozoxidaza este o proteină globulară, având un raport fricțional de 1,21 și raza Stokes de 43 Å. Alți autori arată că glucozoxidaza din *Penicillum amagasakiense* are o structură cuaternară, fiind constituită din patru lanțuri polipeptidice egale. Două lanțuri sunt legate prin legături disulfurice, formând un dimer. Cele două subunități dimerice rezultate sunt asociate necovalent, formând un tetramer.

Unii autori au arătat că glucozoxidaza din *Aspergillus niger* conține numeroase resturi de acid aspartic, acid glutamic resturi de glicină, alanină și leucină, și este săracă în resturi de

cisteină. Componența glucidică a apoenzimei prezintă cantități semnificative de manoză.

Tsuge arată că preparatele de glucozoxidază conțin 74% proteine, 16% glucide, 2% aminoglucide. Situsul de atașare al componentei glucidice de proteină este situat la nivelul unui rest de acid aspartic. Având în vedere faptul că legătura glicozidică este rar întâlnită în glicoproteine, se presupune că atașarea lanțului polipeptidic are loc prin legătura glicozil-amino. S-a demonstrat că partea glucidică are rol în stabilizarea părții proteice, dar nu participă direct în activitatea catalitică, în reactivitatea imunologică sau la menținerea conformației enzimei.

Activitatea glucozoxidazei izolate din ***Aspergillus niger*** prezintă un maxim între valorile de pH cuprinse între 3,5 - 6,5, iar cea din ***Penicillum amagasakeinse*** între valorile de pH cuprinse între 4,5 - 5,5. Glucozoxidaza izolată din fungi prezintă o remarcabilă termostabilitate, activitatea ei menținându-se neschimbată între 30 și 60 C.

Keilin și Hartree au arătat că preparatele de glucozoxidază pot fi stabilizate în prezența substratului ei, glucoza. Acești autori au demonstrat că la pH 8,1 peste 90% din activitatea enzimei este pierdută în numai 10 minute în absența glucozei, față de o pierdere de numai 20%, pentru același interval de timp, dar în prezența glucozei.

Masa moleculară a glucozoxidazei depinde de sursa de izolare, având valori cuprinse între 138 000 -154 000 D pentru glucozoxidaza din ***Penicillum*** și 142 000 - 152 000 D pentru cea din ***Aspergillus niger.***

Glucozoxidaza prezintă o înaltă specificitate de substrat. Enzima oxidează forma beta a glucozei de aproximativ 160 de ori mai rapid decât forma alfa. Glucozoxidaza de tip comercial este folosită ca antioxidant pentru îndepărtarea oxigenului din băuturi, parfumuri, conserve, dar numai în prezența protectoare a catalazei, care previne efectul inactivator al apei oxigenate

asupra glucozoxidazei.

Având în vedere specificitatea de substrat a glucozoxidazei, numeroşi autori au încercat realizarea unor kituri enzimatice, care să permită detectarea rapidă şi exactă a concentraţiei de glucoză în sânge şi în urină. Astfel, Arsene descrie kitul Dextrostix, folosit pentru determinarea glucozei în sânge. Kitul este format dintr-o bandă de hârtie de filtru, impregnată cu glucozoxidază, peroxidază şi un indicator redox. În prezenţa glucozoxidazei, glucoza este oxidată la acid gluconic, cu formare de apă oxigenată. Apa oxigenată nou formată reprezintă substratul peroxidazei, fiind transformată în oxigen, care poate oxida un sistem cromogen indicator. Nuanţa şi intensitatea culorii dezvoltate sunt proporţionale cu concentraţia glucozei din proba de sânge.

Kitul Clinistix este folosit pentru determinarea glucozei din urină şi este format dintr-o bandă de hârtie de filtru impregnată cu glucozoxidază, peroxidază şi orto-toluidină. În prezenţa glucozei urinare, banda de hârtie de filtru se colorează în albastru, modalitate rapidă de determinare calitativă a glucozei urinare, în diabetul zaharat.

Gretton şi Rees au realizat un kit enzimatic care conţine glucozoxidază, un indicator redox care este oxidat de apa oxigenată. Indicatorul redox are formula $R_1 - X - R_2$, în care R sunt grupări aril, care pot avea substituenţi metoxi şi hidroxi, iar X este radicalul (Fig. 56).

$$= (CH = CH)_m - CH = (N - N)_n = CH - (CH = CH)_p =$$

unde: *m*, *n* şi *p* sunt egali cu 0 sau 1.

Fig. 56. **Structura radicalului X aflat în indicatorul redox.**

Când indicatorul redox conţine aldehide - siringicaldehidă, benzaldehidă, 3,4,5-trimetoxibenzaldehidă, 4-etoxi-3 metoxi-benzaldehidă, 3-metoxibenzaldehidă, 3-hidroxi-benzaldehidă, 3-

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

metoxi, 4-hidroxi-benzaldehidă- reacțiile de culoare se dezvoltă rapid, servind mai bine la determinarea cantitativă a glucozei.

Kitul trebuie să conțină și componentele unei soluții tampon pentru a menține pH-ul dorit, în prezența urinei și a proteinelor, de preferință pH-ul trebuie să varieze între 4 și 6. Kitul se poate realiza și sub formă de pudră, tablete sau se poate fixa pe materiale - hârtie de filtru, acetat de celuloză, sticlă, metal, plastic etc, folosindu-se diferite modalități pentru a fixa compoziția pe suportul ales.

Ogawa și Yonetani realizează un kit pentru determinarea glucozei și a galactozei. Hârtia de DEAE - celuloza este imersată succesiv în soluție tampon acid citric - citrat pH 5,6, apoi în soluție de orto - toluidină preparată în metanol, în soluție de glucozoxidază, în soluție de peroxidază și în soluția unui agent de chelatizare. Benzile de hârtie sunt uscate și atașate pe un film de plastic transparent acoperit cu DEAE - celuloza netratată.

Feldman arată că folosindu-se aceste kituri se obțin teste urinare negative (deși pacientul prezintă glucozurie) în cazul unui sindrom carcinoid, în alcaptonurie sau după ingestia de aspirină. În cazurile enumerate anterior, în urină apar acizii gentizic, homogentizic, 5-hidroxi-indolil-acetic, care au proprietatea de a menține orto-toluidina în forma sa redusă.

Hornby a realizat un tub de polistiren, de care a legat chimic glucozoxidaza pentru detectarea automată a concentrațiilor de glucoză cuprinse între 0,5 - 10 mM.

Bergmeyer în 1976 realizează conversia glucozei în acid gluconic, folosind glucozoxidaza și catalaza imobilizate incluse în geluri de poliacrilamidă. În aceleași scopuri Hartmeier, în 1984 imobilizează celule de *Aspergillus niger*. Micelliile de *Aspergillus niger* au fost tratate cu izopropanol, omogenizate cu albumină, la care s-a adăugat o soluție de catalază și glutaraldehidă în izopropanol. Sistemul imobilizat a fost folosit fie ptentru prepararea acidului gluconic din glucoză, fie pentru deoxigenarea berii.

BCU "I. CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

Satoh și Karule au imobilizat glucozoxidaza pentru obținerea de biosenzori atât pentru glucoză cât și pentru oxigen. De asemenea prin copolimerizarea glucozoxidazei și a alfa-glucozidazei, s-a obținut un senzor specific pentru maltoză.

4.2. Metode, tehnici și procedee de imobilizare a glucozoxidazei.

Messing a imobilizat glucozoxidaza prin adsorbție pe sticlă poroasă cu un diamentru al porilor de 595 Å , pe bioxid de siliciu coloidal, pe bentonită, pe oxid de aluminiu activat și măcinat, pe hidroxilapatită în prezența unei soluții de gelatină sau de dextroză 3%, constatând de fiecare dată că preparatul enzimatic insolubilizat prezintă o stabilitate mai mare decât cea a enzimei libere. Un dezavantaj al metodelor de imobilizare prin adsorbție este că suportul trebuie să fie poros și să aibă o mare suprafață specifică pentru reținerea enzimei. Minimul suprafeței superficiale de 5 m^2/g, de preferat mai mare de 25 m^2/g. Materialele suport au pe suprafața superficială oxigenul grupărilor hidroxil, necesar fixării enzimei, prin forțe de adsorbție. Dimensiunea porilor suportului trebuie să fie mai mare sau cel puțin egală cu cea a enzimei, așa încât enzima să intre în pori, iar suprafața internă a suportului să fie total folosită în cursul adsorbției. De regulă diametrul porilor suportului trebuie să fie cuprins între 100 - 1000 Å.

De asemenea Messing a imobilizat pe oxid de titan, prin adsorbție, două enzime cu efect sinergic - glucozoxidaza și catalaza, aceasta acționând asupra apei oxigenate nou formate și protejând în acest mod glucozoxidaza. Autorul constată că după 165 de zile, activitatea remanentă a preparatului imobilizat este de 80%.

Miyamoto imobilizează glucozoxidaza prin adsorbție pe

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cărbune activ şi pe alumină şi prin legături ionice prin folosirea schimbătorului de cationi Amberlite CG - 50.

Barker imobilizează prin legături ionice glucozoxidaza, folosind ca suport oxidul de zirconiu. Oxidul de zirconiu a fost obţinut prin amestecarea sub agitare a unei soluţii de clorură de zirconiu (1,53 g/ml) cu o soluţie de hidroxid de amoniu 2M, adăugată încet şi la valori de pH variind între 4,5 - 8,5. Soluţia de glucozoxidază folosită a fost obţinută prin dizolvarea a 0,0206 g glucozoxidază, cu o activitate de 144 U/mg, în 10 ml tampon fosfat cu pH 7. Contactul enzimă - suport s-a realizat prin adăugarea a 500 ml din soluţia conţinând enzimă peste 2 ml suport, sub agitare la 4 °C, timp de 18 ore. Probele au fost apoi centrifugate şi spălate cu apă distilată de 6 ori cu câte 5 ml. Fiecărei probe i s-a adăugat apoi câte 1 ml apa distilată, iar suspensia obţinută a fost adusă la greutate constantă, prin evaporare la sec la 120 °C.

Glucozoxidaza a fost imobilizată şi prin intermediul legăturilor covalente prin care se realizează legarea enzimei de suport. Astfel Weibel şi Weetall au imobilizat glucozoxidaza prin cuplare diazo pe sticlă poroasă aminosilanizată şi pe CM-celuloză, prin legături peptidice. Gestrelius, tot prin legături peptidice imobilizează glucozoxidaza pe Sepharoza activată cu BrCN. În 1970, Weetall imobilizează glucozoxidaza prin legături tioamidice, folosind un derivat izotiocianat al sticlei poroase aminosilanizate.

Glutaraldehida reprezintă un reactiv bifuncţional mult utilizat. Ea a fost folosită de Weston şi Avrameas pentru legarea glucozoxidazei la AE - poliacrilamidă, iar Broun foloseşte glutaraldehida pentru a lega glucozoxidaza de albumină. Market şi Atallah reuşesc să imobilizeze glucozoxidaza prin folosirea glutaraldehidei ca reactiv bifuncţional de legare de suportul reprezentat de material Englehard aminoalchilat, respectiv material Norton aminoalchilat. Şi Avrameas şi Thomas au imobilizat glucozoxidaza prin legarea ei covalentă de diferite

molecule ale unor proteine - albumina umană, ovalbumina, fibrinogenul, hemoglobina - prin folosirea glutaraldehidei ca agent de legare.

Keyes imobilizează glucozoxidaza pe alumină prin folosirea ca agent de cuplare a unui amestec format din dialdehide. Alumina (1 g) este spălată cu apă distilată și suspendată în 40 ml tampon fosfat de potasiu și sodiu, la valori de pH apropiate de 5,5. Sunt apoi adăugate 50 mg glucozoxidaza (cu o activitate de 149 U/mg) și amestecul rezultat este agitat timp de 90 de minute, la 6 - 8 °C. Acestui amestec i se adaugă 20 ml metanol, 10 ml apă distilată, 0,15 ml acid clorhidric, 0,08 diaminopropan, 0,02 ml dibrometan, la temperatura camerei, timp de 15 minute. Amestecul este agitat peste noapte, la 6 - 8 °C, pe un agitator magnetic. Glucozoxidaza imobilizată pe alumină este spălată cu 2 l apă distilată. Se constată că după 10 zile activitatea remanentă este de 83% (preparatul păstrat în apa distilată la 4 °C).

Barker și Gray au imobilizat glucozoxidaza pe silice, polizaharide, dextran, poliamine, poliesteri, sticlă poroasă, nylon, celuloză, hârtie, oxizi de titan, oxizi de aluminiu sau zirconiu prin folosirea diaminobenzenului ca agent de legare.

Zaborsky și Laskin prezintă o modalitate de activare chimică a glucozoxidazei pentru cuplarea ei la polimeri aminostirenici. Mai întâi enzima este tratată cu un agent oxidant pentru a transforma carbohidratul într-un produs oxidat conținând grupări carbonil sau grupări acetal. Ca agent oxidat este folosită o soluție apoasă conținând acid periodic sau o soluție de periodat de sodiu, cu un pH cuprins între 2,5 - 7,5 și la 5 - 40 °C. Enzima oxidată este pusă în contact cu un polimer insolubil în apă, care conține grupări amino libere. Ca polimer autorii au preferat poliaminostirenul. Activitatea conjugatului glucozoxidaza - poliaminostiren este aceeași cu cea a enzimei native și cu cea a enzimei oxidate. Deci imobilizarea nu afectează în acest caz centrul catalitic activ al enzimei.

Conjugatul a fost păstrat 6 săptămâni în tampon fosfat 100 mM, la pH 5,6. Surprinzător este faptul că glucozoxidaza imobilizată pe poliaminostiren, în condițiile menționate mai sus are o mai mare stabilitate termică.

Avrameas realizează insolubilizarea glucozoxidazei și a peroxidazei în lipsa unui suport, prin folosirea glutaraldehidei, de data aceasta ca agent de legare încrucișată, având loc o "polimerizare" a enzimelor.

Mally arată că enzimele citate mai sus pot fi stabilizate în soluție prin asociere cu polimeri sintetici, sau prin "înghețare" pentru obținerea de preparate uscate. Polimerii utilizați de obicei au fost polivinilpirolidonă, polietilenoxidul, poliacrilamidă, copolimeri ai polivinilpirolidonei și ai polivinilacetatului. Preparatul enzimatic obținut prin înghețare păstrează 42% din activitate, iar enzima asociată cu polietilenoxidul și uscată păstrează 75% din activitate, ceea ce demonstrează efectul protector al polimerului în stabilizarea enzimelor, în timpul procesului de uscare prin îngheț. Aceeași enzimă, prin asociere cu polivinilpirolidona, păstrează prin uscare prin îngheț, la -80 °C, într-o baie de propanol, pentru 1 minut, un procent de 86% din activitate.

Autori precum Wingard, Wieland, Updike, Gestrelius, Kawashiwa, Broun au imobilizat glucozoxidaza prin includere în gel de poliacrilamidă.

Bergmeyer și Jaworek își propun să imobilizeze glucozoxidaza în scopul transformării glucozei în acid gluconic. Glucozoxidarea imobilizată se inactivează rapid, vinovată de această inactivare fiind chiar unul din produșii reacției catalizate de glucozoxidaza și anume apa oxigenată. Pentru a împiedica procesul de inactivare, autorii menționați coimobilizează simultan preparate de glucozoxidaza și catalază. Această ultimă enzimă descompune apa oxigenată înainte ca aceasta să se acumuleze în mediul de reacție în concentrații care sunt critice pentru activitatea glucozoxidazei imobilizate. Imobilizarea

enzimelor s-a realizat folosindu-se ca agent de polimerizare N,N'-metilen-bis-acrilamidă.

Dinelli, Glovenco și Marconi reușesc să obțină preparate de glucozoxidază imobilizată prin includere pe fibre și granule de acetat de celuloză. În acest scop, triacetatul de celuloză este dizolvat în clorura de metil, în dicloretan sau în cloroform la care se adaugă o soluție apoasă de enzima care conține și glicerină, ce îndeplinește rolul de plastifiant. Soluția apoasă de enzimă, care conține și glicerină, este adăugată picătură cu picătură la triacetatul de celuloză solubilizat în unul din solvenții amintiți anterior. Adăugarea are loc sub o agitare continuă, ușoară, iar emulsia rezultată este coagulată pe o baie de toluen. Pentru a îndepărta solventul folosit la dizolvarea triacetatului de celuloză, ca și pentru îndepărtarea toluenului, produsul obținut se filtrează la vid. Se obțin astfel preparate de glucozoxidază imobilizate cu aspect de fire, respectiv de granule.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul V

Materiale și metode folosite în studiul experimental

1. Activarea suportului

Pentru activarea suportului, așa încât acesta să fie capabil să imobilizeze enzime au fost necesare următoarele materiale:

– suport 300 mg. de oxid de titan sau 300 mg. bentonită,

– soluție carbonat de sodiu 0,5M pentru care se cântăresc 5,3 g Na_2CO_3 și se dizolvă în apa distilată, la un volum final de 100 ml,

– soluție NaCl 0,5M pentru care se cântăresc 2,925 g. NaCl și se dizolvă în apa distilată, obținând un volum final de 100 ml,

– soluție acid acetic-acetat, la pH 5,6 obținută astfel: soluția A: 1,15 ml. acid acetic glacial se aduc la 100 ml. cu apa distilată, soluția B: 8,2 g acetat de sodiu anhidru CH_3COONa se aduc la 500 ml. cu apă distilată. Soluția tampon acid acetic-acetat pH 5,6 se obține prin amestecarea a 48 ml soluție A cu 452 ml soluție B și corectarea pH-ului la 5,6.

Activarea suportului a avut loc în următorul mod: 300 mg suport (oxid de titan sau bentonită) au fost suspendate în 9 ml soluție carbonat 0,5M, prin agitare pe baie de apă, timp de 3 ore, la temperatura de 35 °C. După decantare materialul solid a fost spălat de două ori cu câte 9 ml apă distilată, aceste

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

operațiuni, necesitând aproximativ 15 minute. Suportul devine după spălare apt pentru imobilizarea de enzime.

2. Imobilizarea enzimelor pe suport

Imobilizarea enzimelor pe suport presupune aducerea enzimelor în soluție, contactul enzime – suport activat și agitarea amestecului rezultat. Cele două enzime, glucozoxidaza și peroxidaza sunt aduse în soluție în următorul mod: se cântăresc 3 mg glucozoxidază liofilizată cu 250 U/mg și 0,5 mg peroxidază liofilizată cu 225 U/mg, care se aduc la un volum final de 8 ml cu tampon acid acetic-acetat, pH 5,6. Această soluție conținând enzime este adăugată peste suportul solid pregătit anterior (oxid de titan, bentonită), aducându-se tot conținutul la un volum final de 10 ml, cu tampon acid acetic-acetat. Se continuă agitarea 3 ore, la 35 °C. Proba este lăsată la temperatura camerei fără agitare, timp de 30 ore.

3. Determinarea activității enzimatice a soluțiilor de glucozoxidază

Determinarea activității glucozoxidazice a soluțiilor se poate realiza după metoda lui Barton.

1 Principiul metodei

Glucozoxidaza catalizează oxidarea glucozei la acid gluconic și apă oxigenată. Apa oxigenată nou formată reprezintă substratul pentru peroxidaza, capabilă să oxideze orto-dianisidina. În mediu puternic acid, orto-dianisidina

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

oxidată, prezintă o coloraţie specifică roşu-violet, care se poate colorimetra la 530 nm.

● **Soluţii necesare:**

1. Soluţie tampon pH = 5,6
   a) 1,15 ml acid acetic glacial se aduc la 100 ml cu apă distilată.
   b) 8,2 g acetat de sodiu anhidru se aduc la 500 ml
   48 ml. sol. a) + 452 ml sol. b) ⇒ sol. tampon pH = 5,6

2. Soluţie o – dianisidină:
   0,02 g substanţă se dizolvă în 20 ml alcool etilic ⇒ sol. 0,1% (g/v)
   5 ml din soluţia de mai sus (0,1%) se aduc la 100 ml cu soluţie tampon.

3. Soluţie H_2SO_4 50%: 396 ml H_2SO_4 conc. se aduc la 1000 ml cu apă distilată.

4. Soluţie H_2O_2 10 mg/ml

5. Peroxidaza – soluţie 0,2%

6. Soluţie glucoză 8,5% – în soluţie tampon.

● **Modul de lucru**

Amestecul de reacţie conţine: 0,8 ml soluţie peroxidază, 1 ml. soluţie orto-dianisidină, 1 ml soluţie glucoză, 0,2 ml soluţie glucozoxidază. Amestecul este incubat timp de 1 minut la 37 °C. Reacţia este stopată cu 2 ml soluţie H_2SO_4 50%. (Tab. 1).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 1. **Compoziția probelor și a martorului necesar construirii curbei de etalonare, folosite pentru determinarea activității glucozoxidazice.**

Soluția/Proba	1	2	3	4	5	M
1. Peroxidaza	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
2. o-dianisidina	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
3. Glucoza (8,5%)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
4. Soluție H_2O_2 (10mg/ml)	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml	–
5. Apă distilată	0,9 ml	0,8 ml	0,7 ml	0,6ml	0,5 ml	1 ml
6. Cantitate de H_2O_2	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg	–
$A_{530\ nm}$	+2 ml sol. H_2O_2 50%					
	0,1	0,185	0,275	0,345	0,45	–

● **Determinarea concentrației de H_2O_2 (pentru curba de etalonare)**

Factorul soluției de permanganat $KMnO_4$ 0,1 N

$MKMnO_4$ = 158,04

3,3 g. $KMnO_4$.....1000 ml cu apă distilată.

Factorul se determină după câteva zile, folosind ca titrosubstanță acidul oxalic ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$5H_2C_2O_4 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 =$$
$$= 10CO_2 + 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O$$

aproximativ 0,1500 g acid oxalic se dizolvă în aprox. 80 ml apă; se adaugă 10 ml H_2SO_4 10% şi se încălzeşte pe baia de apă la 70 – 80 şC şi se titrează cu soluţie de $KMnO_4$ până la coloraţie roz persistent (soluţia 10% H_2SO_4 : 21,4 ml. sol. 25% H_2SO_4 ..... se aduce la 50 ml cu apă distilată).

$$F = \frac{1000 \cdot G}{e \cdot v}$$

unde: G = cantitatea de titrosubstanţă cântărită (în grame).

e = echivalentul = grame de $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ ce corespund la 1000 ml soluţie titrat

v = volumul de soluţie titrată căreia i se stabileşte factorul.

S-au obţinut:

F_1 = 0,9995

F_2 = 1,0007

F_3 = 0,9988

F = 0,9997

3 ml sol. 1% ..... 9942,0165 mg H_2O_2

1 ml sol. 1% x

$x = \frac{9942,0165}{3}$ = 3314,0055 ug H_2O_2/ml sol. 1% – 33,14% H_2O_2 pentru perhidrol (g/v).

Se prepară o soluţie de H_2O_2 10 mg/ml (250 ml sol.)

250 ml sol. = 2500 mg H_2O_2

3314 mg H_2O_2 ..... 1 ml sol. 1%

2500 mg H_2O_2 x

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$x = \frac{2500}{3314} = 0{,}754 \text{ ml.}$$

0,754 ml sol. 1% ..... 250 ml cu apă distilată.

● **Curba de etalonare**

Pentru construirea curbei de etalonare se lucrează cu concentrații cunoscute de apă oxigenată. Citirea probelor se face la 530 nm, după 10 minute de la stoparea reacției cu acid sulfuric.

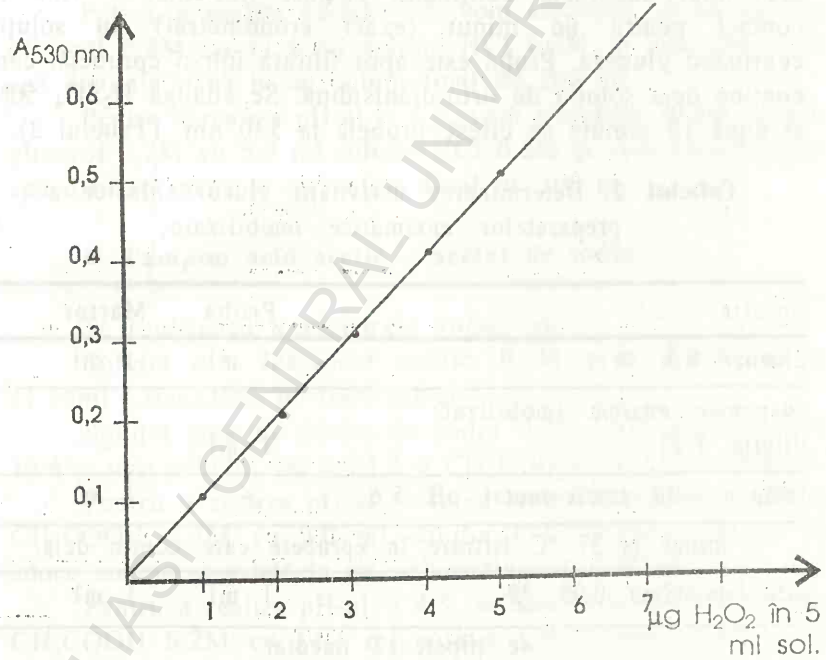


Fig. 56. **Curba de etalonare pentru determinarea activității glucozoxidazice**

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Determinarea activității glucozoxidazei imobilizate

Principiul metodei este același cu cel pentru determinarea activității glucozoxidazei nelegate. Nu mai este necesară adăugarea unei soluții de peroxidază. Totuși determinarea activității glucozoxidazice a preparatelor imobilizate nu poate avea loc direct din cauză că o-dianisidina se adsoarbe și ea pe suportul pe care sunt imobilizate cele două enzime. Weetall rezolvă acest inconvenient, prin separarea în spațiu a reacției de oxidare a glucozei de cea de oxidare a o-dianisidinei. Astfel, mai întâi suspensia conținând enzime imobilizate, vine în contact pentru un minut (exact cronometrat) cu soluția conținând glucoza. Proba este apoi filtrată într-o eprubetă, care conține deja soluția de orto-dianisidină. Se adaugă H_2SO_4 50% și după 10 minute se citesc probele la 530 nm. (Tabelul 2).

Tabelul 2. Determinarea activității glucozoxidazice a preparatelor enzimatice imobilizate

Soluția	Proba	Martor
glucoză 8,5 %	1 ml	1 ml
suspensie enzime imobilizate diluție 1/25	1 ml	–
tampon acid acetic-acetat pH 5,6	–	1 ml
1 minut la 37 °C filtrare în eprubete care conțin deja:		
orto-dianisidina 0,05 %	1 ml	1 ml
se pipetează imediat		
H_2SO_4 50%	2 ml	2 ml
după 10 minute se citesc la 530 nm.		

5. Determinarea pH-ului optim de acțiune

Se determină activitatea glucozoxidazică a enzimei nelegate după metoda lui Barton și cea a enzimei legate după metoda lui Weetall, înlocuind de fiecare dată tamponul acetat cu următoarele tampoane:

■ Tampon glicocol - HCl

Se realizează soluția glicol 0,2 M, prin cântărirea a 15,1 grame glicocol și dizolvarea lor în apă, aducându-se soluția la un volum final de 1000 ml.

Pentru a realiza pH-ul = 3, vom amesteca 50 ml soluție glicocol 0,2M cu 11,4 ml soluție HCl 0,2M, și adăugăm apoi apă distilată până la un volum final de 200 ml.

Pentru a realiza pH-ul = 3,5, vom amesteca 50 ml soluție glicocol 0,2M cu 5,7 ml soluție HCl 0,2M și vom completa cu apă distilată până la un volum final de 200 ml.

■ Tampon acid acetic – acetat de sodiu

Se realizează următoarele soluții stoc:

Soluția stoc de acid acetic 0,2M prin dizolvarea a 11.55ml CH_3COOH în 1000 ml și

Soluția stoc de acetat de sodiu 0,2M, prin dizolvarea a 16,4 g sare anhidră sau a 27,2 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ la 1000 ml.

Pentru a realiza pH-ul = 4, se amestecă 41,0 ml soluție CH_3COOH 0,2M cu 9,0 ml soluție CH_3COONa 0,2M și se aduce cu apă distilată la un volum final de 100 ml.

Pentru a realiza pH-ul = 4,5, se amestecă 30,5 ml soluție CH_3COOH 0,2M cu 24,1 ml soluție CH_3COONa 0,2M și se aduce cu apă distilată la un volum final de 100 ml.

Pentu a realiza pH-ul = 5, vom amesteca 14,8 ml soluție CH_3COOH 0,2M cu 35,2 ml soluție CH_3COONa 0,2M și vom

BCU „ȘTEFAN CEL MARE" UNIVERSITY LIBRARY

aduce la 100 ml cu apă distilată.

Pentru a realiza pH-ul = 5,5 se amestecă 5,9 ml soluție CH_3COOH cu 43,88 ml soluție CH_3COONa, ambele de concentrație 0,2M și se completează cu apă distilată până la 100 ml.

■ Tampon $NaHPO_4$ – NaH_2PO_4

Sunt realizate următoarele soluții stoc:

Soluție NaH_2PO_4 0,2M (27,8 g. în 1000 ml apă) (soluția A)

Soluție Na_2HPO_4 0,2M (53,65 g Na_2HPO_4 $7H_2O$ sau 71,7 g Na_2HPO_4 $12H_2O$ în 1000 ml) (soluția B)

Pentru a realiza pH-ul = 6,0, vom amesteca 87,7 ml A cu 12,3 ml B și vom aduce cu apă distilată până la 200 ml.

Pentru a realiza pH-ul = 6,5, vom amesteca 68,5 ml A cu 6,5 ml B și vom aduce apă distilată până la 200ml.

Pentru a realiza pH-ul = 7,0 vom amesteca 39,0 ml A cu 61,0 ml B și vom aduce cu apă distilată până la 200ml.

Pentru a realiza pH-ul = 7,5 vom amesteca 16,0 ml A cu 7,5 ml B și vom aduce cu apă distilată până la un volum final de 200 ml.

Pentru a realiza pH-ul = 8,00 vom amesteca 5,3 ml A cu 94,7 ml B și vom aduce cu apă distilată până la un volum final de 200 ml.

■ Tampon glicocol – NaOH

Au fost necesare: soluție glicocol 0,2M (15,01 g la 1000 ml) și soluție NaOH 0,2M.

Pentru a realiza pH-ul = 8,5 vom amesteca 50 ml soluție glicocol 0,2M cu 3 ml soluție NaOH 0,2 și se aduce cu apă distilată, la un volum final de 200 ml.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. Determinarea influenței concentrației substratului asupra activității glucozoxidazice

Determinările se realizează după aceleași metode, lucrând cu concentrații cunoscute de glucoză. Se realizează o soluție de glucoză 0,5M (9 g glucoză se dizolvă în apa distilată, obținând un volum final de 100 ml), din care se realizează probe cu următoarele concentrații molare inițiale (tabel 3).

Tabelul 3. Concetrațiile molare inițiale ale probelor realizate pentru determinarea influenței concentrației substratului asupra activității enzimatice.

Soluție glucoză 0,5 M (ml)	Apă distilată (ml)	Concentrația molară a glucozei moli/l	Proba
0,1	0,9	0,05	1
0,2	0,8	0,10	2
0,3	0,7	0,15	3
0,4	0,6	0,20	4
0,5	0,5	0,25	5
0,6	0,4	0,30	6
0,7	0,3	0,35	7
0,8	0,2	0,40	8
0,9	0,1	0,45	9
1,0	–	0,50	10

BCUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru aflarea lui K_M se folosește metoda propusă de Lineweaver și Burk de reprezentare grafică a lui 1/v în funcție de 1/s. Se obține o dreaptă a cărei pantă este egală cu K_M/V_{max} și care intersectează abscisa într-un punct egal cu $-1/K_M$.

7. Determinarea temperaturii optime de acțiune a glucozoxidazei

Determinarea temperaturii optime de acțiune a glucozoxidazei libere cât și cea a preparatelor de enzime imobilizate s-a realizat la temperaturi cuprinse între 25 – 55 °C.

8. Determinarea stabilității în timp a preparatelor enzimatice imobilizate

Determinările de activitate au fost realizate pe baza metodei lui Weetall, determinările având loc după un număr variabil de zile. În restul timpului, suspensiile curpinzând preparatele enzimatice imobilizate au fost păstrate în flacoane bine închise și la frigider (4 °C).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. T. Watanabe, M. Fujimura, T. Mori, T. Tosa and Chibata, *J. Appl. Biochem*, 1,28 (1979)
2. R.A. Messing, *Enzymologia, 39,* 12 (1970)
3. R.A. Messing, *Biotehnol. Bioeng., 16*, 897 (1974)
4. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse and Chibata, *Enzymologia, 31*, 214 (1966)
5. K. Martinek, V.S. Goldmacher, A.M. Kilibanov and I.V. Berezin, *FEBS Letters, 51*, 152 (1975)
6. L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas and Y. Levin, *Biochemistry, 9*, 2322 (1970)
7. S. Ikeda and S. Fukui, *FEBS Letters, 41*, 216 (1974)
8. S. Gestrelius, B. Mattiasson and K. Mosbach, *Biochim. Biophys. Acta, 276*, 339 (1972)
9. S. Henry, J. Koczan and T. Richardson, *Biotechnol, Bioeng., 16*, 289 (1974)
10. W.H. Scouten, *Affinity Chromatography, Principles and methods, Ph. F. Chem. Suedia., 23* (1981)
11. I. DUMITRU and D. Iordăchescu în *Biotehnologii moderne*, Ed. tehnica București, 1990
12. H.R. Horton, H.E. Swaisgood and K. Mosbach, *Biochem, Biophys, Res. Commun, 61*, 1118 (1974)
13. J.E. Brotherton, A. Emery and V.W. Rodwell, *Biotechnol. Bioeng., 18*, 527 (1976)
14. M.T. Atallah, B.P. Wasserman and H.O. Hultin, *Biotechnol. Bioeng., 18* , 1833 (1976)
15. I. Ugi, *Angew. Chem., 74*, 9 (1962)
16. P.A. Biondi, M. Pace, O. Brenna and P.g. Pietta, *Eur. J. Biochem., 61*, 171 (1976)
17. T. Mori, T. Tosa and I. Chibata, *Cancer Res., 34*, 3066 (1974)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

18. S. Fukui, A. Tanaka, T. Iida and E. Hasegawa, *FEBS Letters, 66*, 179 (1976)
19. S.J. Updike and G.P. Hicks, *Nature, 214*, 986 (1967)
20. S. Gestrelius, B. Mattiasson and K. Mosbach, *Eur. J. Biochem., 36*, 89 (1973)
21. I.F. Dumitru and d. Iordăchescu, *Enzime*, Editura Medicală, București (1974)
22. R.R. Barton *Anal Biochem., 14*, 258 (1966)
23. I.F. Dumitru, D. Iordăchescu, St. Teodosiu - Mogoș, *"Biochimie practică"* Tipografia Universității din București p. 106 (1980)
24. W. Hartmeier and t. Doeppner, *Ger. Offen* DE 3301992 (1984)
25. H.H. Weetall and L.S. Hersh, *Biochim. Biophys. Acta., 66*, 87 (1969)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 973-578-789-X